

# **Assembly von Influenzaviren: Analyse von Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden**

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

Eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Stephanie Vanessa Engel

geb. am 12.02.1981 in Pfullendorf, Deutschland

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Herrmann
2. PD Dr. M. Veit
3. Prof. Dr. E. Ponimaskin

Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>VI</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DAS INFLUENZAVIRUS .....	1
1.2 DAS GLYKOPROTEIN HÄMAGGLUTININ .....	4
1.2.1 Mechanismus der HA-induzierten Membranfusion .....	6
1.2.2 Proteinbiosynthese, Prozessierung und Transport des Hämagglutinins .....	8
1.2.3 Zusammenbau und Freisetzung von Influenzaviren.....	10
1.3 MEMBRAN-RAFTS.....	12
1.3.1 Methoden zur Untersuchung von Membran-Rafts.....	14
1.4 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER MEMBRANASSOZIATIONSEIGENSCHAFTEN VON HA IM LEBENDEN SYSTEM .....	15
1.4.1 FRAP .....	15
1.4.2 FLIM-FRET.....	17
<b>2 ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL .....</b>	<b>22</b>
3.1 BIOLOGISCHES MATERIAL .....	22
3.1.1 Zellen .....	22
3.1.2 Bakterien .....	22
3.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	22
3.2.1 Zellkulturreagenzien .....	22
3.2.2 Chemikalien.....	22
3.2.3 Enzyme und Antikörper .....	23
3.2.4 Plasmide und Oligonukleotide.....	24
3.3 KITS .....	27
3.4 GERÄTE UND MATERIAL .....	28
3.5 PUFFER UND MEDIEN.....	28
3.5.1 Zellkulturmedien .....	28
3.5.2 Puffer .....	29
<b>4 METHODEN .....</b>	<b>30</b>

4.1	MOLEKULARBIOLOGIE .....	30
4.1.1	<i>Polymerasenkettenreaktion .....</i>	30
4.1.2	<i>Restriktionsverdau und Reinigung von Plasmiden und PCR-Produkten.....</i>	31
4.1.3	<i>Ligation und Transformation der DNA-Fragmente .....</i>	32
4.1.4	<i>Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen .....</i>	33
4.2	ZELLKULTUR.....	33
4.2.1	<i>Kultivierung von Zellen.....</i>	33
4.2.2	<i>Transfektion .....</i>	34
4.2.3	<i>Inhibitoren .....</i>	35
4.2.4	<i>Extrazelluläre Spaltung von HA mit Trypsin .....</i>	36
4.3	BIOCHEMIE .....	37
4.3.1	<i>Western Blot.....</i>	37
4.3.2	<i>Lipid-Raft-Aufreinigung.....</i>	38
4.3.3	<i>Radioaktive Markierung von Proteinen .....</i>	38
4.4	KONFOKALMIKROSKOPIE.....	41
4.4.1	<i>Polares Wachstum der Zellen .....</i>	41
4.4.2	<i>FRAP .....</i>	42
4.4.3	<i>FLIM-FRET.....</i>	43
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
5.1	KONSTRUKTION DER RAFT-MARKER.....	48
5.1.1	<i>Gap43-YFP .....</i>	48
5.1.2	<i>MyrPal-YFP .....</i>	49
5.2	KONSTRUKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON FLUORESCENZ-MARKIERTEM HA.....	50
5.2.1	<i>Der Linker zwischen HA und dem Fluorophor ist entscheidend für den Transport des Konstrukts an die Plasmamembran .....</i>	50
5.2.2	<i>Alle HA-L-Cerulean-Konstrukte werden korrekt prozessiert und an die Plasmamembran transportiert .....</i>	53
5.3	DIE DELETION DES DRM-SIGNALS DER TRANSMEMBRANREGION VERZÖGERT DEN TRANSPORT VON HA ZUR PLASMAMEMBRAN .....	60
5.4	UNTERSUCHUNG DER RAFT-AFFINITÄT VON UNGESPALTENEM HA .....	67
5.4.1	<i>Kontrollexperimente zur Evaluierung der FLIM-FRET-Methode für die Untersuchung der Raft-Affinität von HA.....</i>	68
5.4.2	<i>HA-Kluster mit dem Raft-Marker sind Cholesterin-abhängig .....</i>	70
5.4.3	<i>Die HA-Lokalisation in Rafts ist abhängig von den DRM-Signalen des Proteins .....</i>	72
5.4.4	<i>Das Zytoskelett unterstützt den Einbau von HA in Rafts .....</i>	73

5.5	DIE LATERALE DIFFUSION IN DER MEMBRAN IST ABHÄNGIG VON DER LOKALISATION DES PROTEINS .....	76
5.6	DIE MEMBRANFUSION-KATALYSIERENDE KONFORMATIONSÄNDERUNG DES HA VERRINGERT SEINE RAFT-AFFINITÄT .....	79
5.6.1	<i>Intrazellulär gespaltenes HA assoziiert weniger mit Rafts als ungespaltenes HA.....</i>	<i>79</i>
5.6.2	<i>Gespaltenes HA bildet keine unbeweglichen Aggregate in der Zellmembran. ....</i>	<i>80</i>
5.6.3	<i>Furin- und Trypsin-gespaltenes HA haben die gleiche Raft-Affinität .....</i>	<i>82</i>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
6.1	DER TRANSPORT VON HA ZUR PLASMAMEMBRAN WIRD DURCH DEN AUSTAUSCH DER ERSTEN AMINOSÄUREN DER TRANSMEMBRANREGION VERZÖGERT.....	85
6.2	DIE HA-MUTANTEN HABEN EINE AUSWIRKUNG AUF DIE RAFT-AFFINITÄT VON HA (ZU FLIM-FRET) .....	89
6.3	DIE RAFT-AFFINITÄT VON HA BEEINFLUSST DESSEN DIFFUSIONSGESCHWINDIGKEIT IN DER MEMBRAN .....	91
6.4	DIE KONVERTIERUNG DER PH-7- ZUR PH-5-KONFORMATION VON HA BEEINFLUSST DESSEN RAFT-ASSOZIATION .....	94
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>98</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>109</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>110</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>112</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Alanin
C	Cystein
Cer	Cerulean
CFP	engl. für cyan fluorescent protein bau fluoreszierendes Protein
CHO	engl. für chinese hamster ovary cells Zelllinie aus den Eierstockzellen des chinesischen Hamsters
cl.	engl. für cleaved HA wird dabei intrazellulär von einer Protease gespalten
Cyto D	Cytochalasin D
Da	Dalton, molare Masse (g/mol)
DIC	engl. für differential interference contrast Differential-Interferenz-Kontrastbild
DNA	engl. für deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DRM	Detergenz-resistente Membranen
ER	endoplasmatisches Retikulum
Endo-H	Endoglykosidase H
FLIM	engl. für fluorescence lifetime imaging microscopy Fluoreszenz-Lebenszeit-Bildmikroskopie
FPALM	engl. für fluorescence photoactivation localization microscopy Fluoreszenz-Photoaktivierungs-Lokalisierungs-Mikroskopie
FRAP	engl. für fluorescence recovery after photobleaching Fluoreszenzrückgewinnung nach Photobleichen
FRET	Försters-Resonanz-Energie-Transfer
FRET-E%	FRET-Effizienz in Prozent
HA	Hämagglutinin
HA <sub>0</sub>	fusionskompetente Form des Hämagglutinins
HA <sub>1</sub> , HA <sub>2</sub>	Untereinheiten des Hämagglutinins
HIV	humanes Immundefizienzvirus

I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
L <sub>d</sub>	engl. für liquid disordered; ungeordnete Bereiche der Membran
L <sub>o</sub>	engl. für liquid ordered; geordnete Bereiche der Membran
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2, Ionenkanal des Influenzavirus
MDCK-II	engl. für Madin-Darby canine kidney Zelllinie aus Hundenieren
Myr	myristyliert
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin
NA	Neuraminidase
Pal	palmityliert
PBS	engl. für phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PNGase-F	Peptid-N-Glykosidase F
R	Arginin
RNA	engl. für ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
uncl.	engl. für uncleaved nicht intrazellulär gespaltene Mutante von HA
V	Valin
wt	Wildtyp
YFP	engl. für yellow fluorescent protein gelb fluoreszierendes Protein

## Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass das Influenzavirus-Glykoprotein Hämagglutinin (HA) für seine Funktion sowohl bei der Virusfreisetzung als auch bei der Fusion von viraler und zellulärer Membran mit Cholesterin- und Sphingolipidreichen Domänen, sogenannten Membran-Rafts, assoziiert sein muss. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Membran-Raft-Affinität von HA in lebenden Zellen mittels FLIM-FRET gemessen werden. Dabei wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung (FLIM) der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) von fluoreszenzmarkiertem HA auf den etablierten Raft-Marker MyrPal-YFP bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass beide Proteine in gemeinsamen Klustern in der Plasmamembran vorkommen. Durch Cholesterinentzug wie auch durch den Einsatz von Cytochalasin D, welches die Mikrofilamente zerstört, konnte diese Clusterbildung reduziert werden. Man kann somit davon ausgehen, dass sowohl die Membran-Rafts als auch das mit der inneren Membranlipidschicht verbundene Aktinnetzwerk synergistisch zu dieser Clusterbildung beitragen.

Mittels FLIM-FRET und FRAP (Fluoreszenz-Rückgewinnung nach Photobleichen) konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die Palmitoylierung und die stark hydrophoben Aminosäuren zu Beginn der Transmembrandomäne (TMD), beides wichtige Signale für die Detergenslöslichkeit von HA in Triton-Extraktionsexperimenten, auch im lebenden System eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus konnten biochemische Experimente bezüglich der Prozesseigenschaften von HA zeigen, dass die hydrophoben Aminosäuren zu Beginn der TMD den Transport entscheidend verzögern, jedoch erst nach der erfolgten Trimerisierung des Proteins. Diese Verzögerung des Transports ist demnach vermutlich auf einer erschwerten Integration dieser Proteine in die Membran-Raft-Domänen begründet.

Die Auslösung der viralen Fusion mit der Wirtszellmembran setzt eine irreversible Konformationsänderung von HA voraus, die bei pH 5 erfolgt. FLIM-FRET-Messungen zeigten für die pH-5-Konformation von HA eine verglichen mit der pH-7-Konformation verringerte Clusterbildung mit dem Raft-Marker. Es ist somit offensichtlich, dass die Membranfusion-vermittelnde HA-Konformation eine verringerte Raft-Affinität besitzt. Dabei ist es möglich, dass diese verringerte Raft-Affinität eine wichtige Rolle bei der Störung der Lipide an der Fusionsstelle spielt und somit die Bildung und/oder Vergrößerung der Fusionspore erleichtert.

## Summary

It has been supposed that the hemagglutinin (HA) of influenza virus is recruited to cholesterol- and sphingolipid-enriched domains, also named membrane-rafts, to accomplish its function in virus budding and membrane fusion. This study aimed at verifying the affinity of HA for membrane-rafts in living cells using fluorescence-lifetime imaging microscopy to measure Förster's resonance energy transfer (FLIM-FRET). FLIM-FRET revealed strong clustering between a fluorescence-tagged HA-protein and the well-established raft-marker MyrPal-YFP in CHO cells. Clustering was significantly reduced when rafts were disintegrated by cholesterol depletion and when the cells were treated with the microfilament disrupting agent cytochalasin D. Thus, both membrane-rafts as well as the actin meshwork lining the inner leaflet of the membrane contribute synergistically to clustering.

Clustering was also reduced by the removal of the known signals for the association of HA with detergent-resistant-membranes, the palmitoylation and the first amino acids in the transmembrane region. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments confirmed the above discussed result. Indeed mutants showing less raft affinity presented a higher diffusion coefficient. Since these mutations are obviously important for the raft-association of HA their behaviour during their processing and transport through the ER and the Golgi-complex was studied. These investigations showed that the exchange of the first three amino acids of the transmembrane region of HA led to a decelerated transport after trimer-formation of the protein, probably due to retarded integration of these proteins into membrane-raft domains.

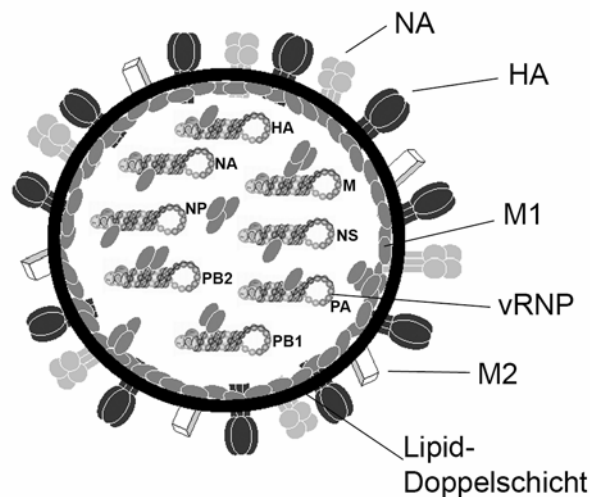
Mediating viral fusion with the host cell membrane requires an irreversible conformational change of HA. The study of this low pH conformation with FLIM-FRET unveiled that the clustering with the raft-marker is decisively reduced compared to the pre-fusion conformation of the protein. Thus it might be assumed that the HA conformation which initiates membrane fusion reduces the affinity of the protein for membrane-rafts. Therefore it is likely that this reduced affinity for rafts after the conformational change is relevant to cause perturbation of lipids at the fusion site and thereby facilitating the formation and/or enlargement of the fusion pore.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Influenzavirus

Das Influenzavirus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae*, die in die vier Gattungen Influenza A, B, C und die Thogoviren unterteilt ist. Influenza-B-Viren konnten bisher nur aus dem Menschen und aus Robben isoliert werden, Influenza-C-Viren nur aus Mensch und Schwein. Im Gegensatz dazu ist das Influenza-A-Virus sehr weit verbreitet und kommt außer beim Menschen auch bei vielen anderen Säugetierarten (insbesondere Schwein und Pferd) und Vögeln vor. Die Isolation des Influenzavirus gelang erstmals 1933, 15 Jahre nach dem Ausbruch der „spanischen Grippe“, bei der schätzungsweise 20 bis 50 Millionen Menschen starben. Auch heute noch fordert die Grippe jährlich bis zu einer Million Tote weltweit. Die Gefährlichkeit dieser Viren ist vor allem auf die häufige Mutationsrate der viruseigenen Oberflächenproteine zurückzuführen. Beim Menschen beschränkt sich die Influenza-A-Infektion im Normalfall auf den Befall des Respirationstraktes und führt so zu den üblichen Symptomen der Grippe. Hochpathogene Subtypen können in Vögeln dagegen eine systemische Infek-

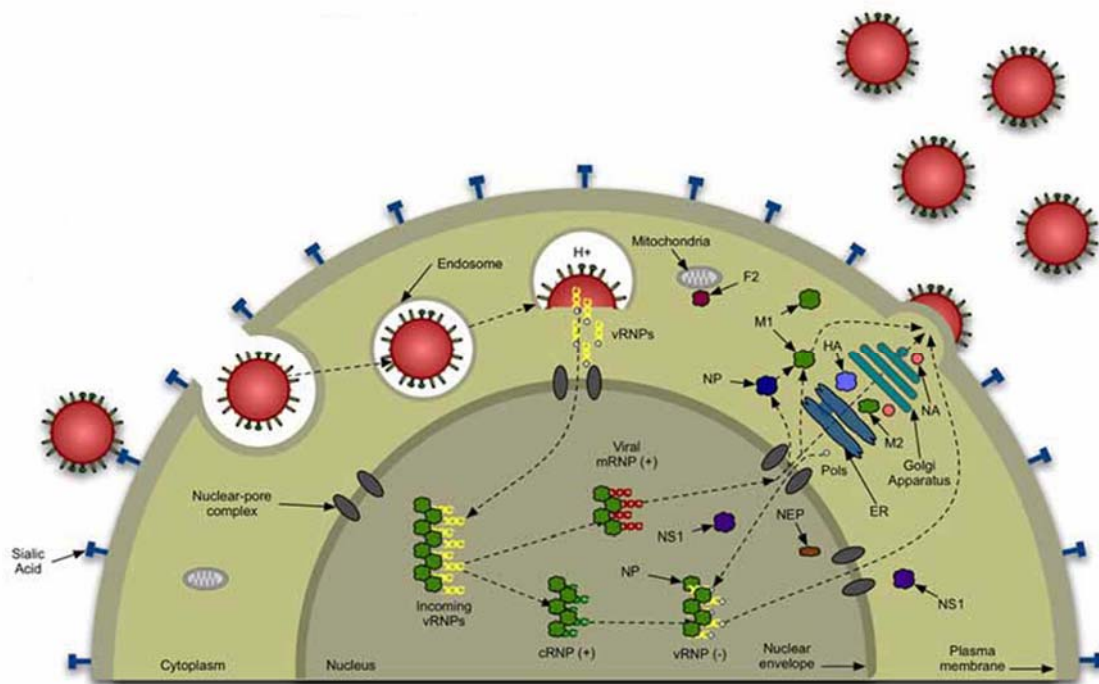


**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenzavirus.** Die viralen Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) und der Ionenkanal M2 sind in die virusumhüllende Lipiddoppelschicht eingelagert. Die Innenseite dieser Doppelschicht wird von dem Matrixprotein M1 ausgekleidet. Im Virusinneren befindet sich das virale Genom, das aus acht segmentierten RNA-Strängen besteht, die eine negative Polarität besitzen. Jede RNA bildet dabei mit dem Nukleoprotein NP und dem viralen Polymerasekomplex aus PB1, PB2 und PA einen Ribonukleoproteinkomplex (vRNP).

tion hervorrufen, wie sie unter dem Namen „Geflügelpest“ oder neuerdings auch „Vogelgrippe“ bekannt geworden ist (Klenk und Rott, 1988).

Influenzaviren haben einen Durchmesser von 80 bis 120 nm und sind meist kugel- oder fadenförmig. Die Hüllmembran, die die Viren umgibt, entsteht durch das Abschnüren der Viren aus der Plasmamembran der Wirtszellen (Klenk, 1974). Anstelle der zellulären Glykoproteine sind in die virale Membran allerdings fast ausschließlich die viralen Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert (Whittaker, 2001) (Abb. 1). Hierbei sind bislang 16 verschiedene Hämagglutinin- und 9 verschiedene Neuraminidase-Subtypen beschrieben worden. Dementsprechend werden die Virusisolate auch benannt, wie zum Beispiel H5N1. Für die Infektion einer Wirtszelle bindet das Hämagglutinin an Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche (Abb. 2) und löst damit die Endozytose des Virus aus. Der saure pH des Endosoms führt dann zu einer Konformationsänderung des Hämagglutinins, wodurch ein Fusionspeptid freigelegt wird, das sich in der endosomalen Membran verankert. Die Krümmung von HA führt schlussendlich zur Fusion der zellulären und viralen Membran. Die Neuraminidase dient vor allem der enzymatischen Abspaltung der Sialinsäure von zellulären Glykolipiden und Glykoproteinen. Ansonsten würden neu gebildete Virionen wieder daran binden, und dies würde zu einer Aggregation der Virionen untereinander und mit der Wirtszellmembran führen (Palese et al., 1974). Des Weiteren durchspannen wenige Kopien des Ionenkanals M2 die Virushülle. Die Innenseite der Virushülle wird von dem Matrixprotein M1 ausgekleidet, welches somit die Virushülle stabilisiert (Müller, 2006).

Gleichzeitig bindet M1 an die viralen RNPs. Durch den M2-Ionenkanal strömen deshalb während des Fusionsprozesses Protonen in das Virusinnere, um M1 von dem viralen Genom zu trennen und somit die Freisetzung des viralen Genoms einzuleiten (Martin und Helenius, 1991). Möglicherweise spielt die Neuraminidase auch eine Rolle bei der Fusion der Viren, indem sie HA wieder vom Wirtszellrezeptor trennt, wenn keine Endozytose stattgefunden hat (Huang et al., 1980).



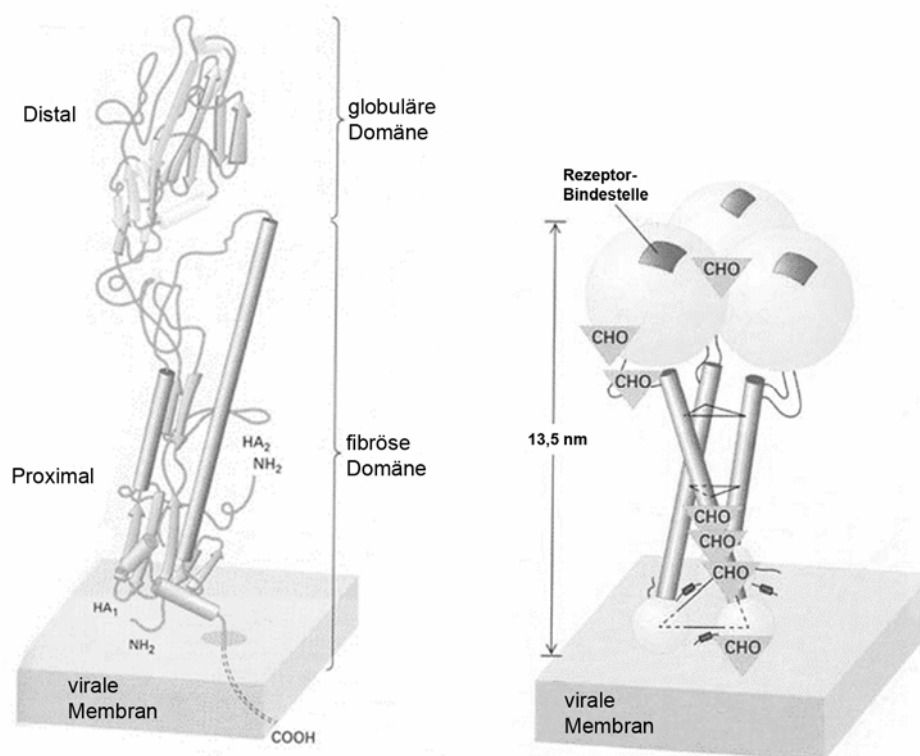
**Abbildung 2: Der Replikationszyklus der Influenzaviren.** Die Viren binden mittels HA an Sialinsäure auf der Zelloberfläche, was die Endozytose der Viren auslöst. Durch das saure Milieu im Endosom vermittelt HA die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, und das Genom wird in das Zytoplasma entlassen. Die Replikation des Genoms findet im Zellkern statt, die Synthese der viralen Proteine im Zytoplasma bzw. in ER und Golgi-Apparat. Anschließend werden alle viralen Komponenten an die Plasmamembran transportiert, wo der Zusammenbau und die Freisetzung neuer Virionen stattfinden. Nach (Krug und Lamb, 2001).

Die zehn Proteine der Influenzaviren werden von acht RNA-Segmenten kodiert, die eine negative Polarität besitzen. Jedes RNA-Segment liegt als Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) vor, der aus der RNA, den basischen Proteinen (PB1 und PB2), dem sauren Protein (PA) und dem Nukleoprotein (NP) besteht. PB1, PB2 und PA bilden hierbei den RNA-Polymerase-Komplex, der für die Replikation des Virusgenoms und die Synthese der Boten-RNA (mRNA) verantwortlich ist. Den größten Proteinanteil des RNP-Komplexes bildet das Nukleoprotein (NP), welches durch die Assoziation mit der RNA eine helikale Struktur ausbildet (Klumpp et al., 1997). Der RNP-Komplex wird nach der Trennung von M1 in das Zytoplasma entlassen und in den Zellkern transportiert. Ein wichtiges Kernimportsignal enthält hierbei das NP-Protein, welches darüber hinaus für die Umschaltung der Synthese von mRNA zu der Synthese von cRNA und dann zur Synthese von vRNA verantwortlich ist (Steinhauer und Skehel, 2002). Nach der erfolgreichen Replikation des Genoms wird dieses aus dem Kern exportiert. An diesem Export sind das M1-Protein (Bui et al., 2000; Müller, 2006) und auch das Nichtstrukturprotein2 (NS2) beteiligt (Cros und Palese, 2003). Weitergehende Untersu-

chungen haben hierbei gezeigt, dass jedoch nur das NS1-Protein ein wirkliches Nichtstrukturprotein des Influenzavirus ist, da NS2 mit M1 interagiert, dabei in das Virus eingebaut wird und somit zum Strukturprotein wird (Akarsu et al., 2003). Die Funktion von NS1 besteht vor allem darin, die Expression zellulärer mRNA zu hemmen (Aragon et al., 2000). Auch M1 besitzt eine regulierende Funktion beim Translationsprozess (Müller, 2006; Nayak et al., 2004). Während der Vermehrung des viralen Genoms werden die viralen Proteine im Zytoplasma bzw. HA, NA und M2 in ER und Golgi synthetisiert. Das M2-Protein sorgt hierbei im TGN für einen neutralen pH während der viralen Replikation und verhindert so eine frühzeitige Konformationsänderung von HA von der pH-7- in die pH-5-Konformation, die später genauer erläutert werden (Sakaguchi et al., 1996). Nachdem alle viralen Komponenten repliziert worden sind, werden sie zur Plasmamembran transportiert, zu neuen Viren zusammengebaut und schnüren sich dann von der Plasmamembran ab. Im Folgenden soll nun genauer auf die Funktion von Hämagglutinin im viralen Replikationszyklus eingegangen werden.

## **1.2 Das Glykoprotein Hämagglutinin**

Hämagglutinin ist ein homotrimerer Proteinkomplex. Jedes Monomer besteht aus zwei durch Disulfidbrückenverbundenen Polypeptiden ( $HA_1$ ,  $HA_2$ ), die durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläufer  $HA_0$  entstehen (Klenk et al., 1975). In der nativen Form hat ein Monomer eine Länge von ungefähr 13 nm und besteht aus ungefähr 560 Aminosäuren. Die Spaltstelle zwischen  $HA_1$  und  $HA_2$  ist wesentlich für den Grad der Pathogenität des Virus verantwortlich, da nur gespaltenes HA Membranfusion katalysieren kann. Ein hochpathogenes Virus besitzt hier eine polybasische Spaltstelle mit einem R-X-K/R-R-Motiv. Diese Spaltstelle wird im Trans-Golgi-Netzwerk von zelleigenen Proteasen erkannt. Diese Proteasen kommen in fast allen Zelltypen vor, und so kann sich das Virus leicht im gesamten Organismus vermehren. Nur wenige HA-Subtypen, zum Beispiel der in dieser Arbeit verwendete HA-Subtyp aus dem hochpathogenen Virus der klassischen Geflügelpest, besitzen diese polybasische Spaltstelle (Garten und Klenk, 1999). Im Gegensatz dazu besitzen nicht- oder gering-pathogene aviäre und alle humanen Influenzaviren eine monobasische Spaltstelle (Arginin). Die für die Prozessierung notwendige Protease kommt nur in wenigen Zelltypen oder Geweben vor, beim Menschen nur im Respirationstrakt, so dass die Virusreplikation auf dieses Organ beschränkt bleibt.

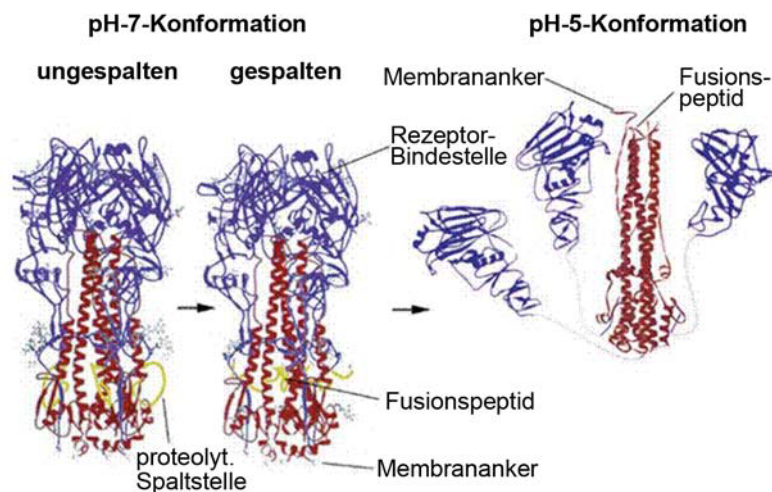


**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Hämagglutinin.** Links ist die Tertiärstruktur der Ektodomäne eines HA-Monomers dargestellt, die durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurde. Rechts ist die Ektodomäne eines HA-Trimers dargestellt, wobei jedes Monomer aus einer globulären Kopfgruppe und einer fibrösen Domäne besteht. CHO symbolisiert die Glykosylreste, die N-glykosidisch mit HA verknüpft sind. Zur Verfügung gestellt von M. Veit (FU Berlin).

Die Einteilung der Viren in die verschiedenen Subtypen, wie H5N1 oder H7N1, erfolgt anhand der Aminosäuresequenz der wichtigsten Oberflächenantigene HA und NA. Diese antigenen Epitope von HA befinden sich dabei in der HA<sub>1</sub>-Untereinheit. HA<sub>1</sub> besteht aus etwa 340 Aminosäuren. An seinem N-Terminus befindet sich die Signalsequenz, die für die Translation an ER-gebundene Ribosomen sorgt und somit für die Insertion von HA in das ER verantwortlich ist. Außerdem liegt die Rezeptorbindungsstelle in der HA<sub>1</sub>-Untereinheit (Abb. 3). HA<sub>2</sub> besteht aus ungefähr 220 Aminosäuren und beinhaltet das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne (TMD). Außerdem bilden die letzten elf Aminosäuren den zytoplasmatischen Schwanz des Proteins (Gething et al., 1986). Die Hauptaufgabe des Hämagglutinins besteht in der Rezeptorbindung an die Wirtszelle und der Fusion der viralen mit der endosomalen Membran. Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden.

### 1.2.1 Mechanismus der HA-induzierten Membranfusion

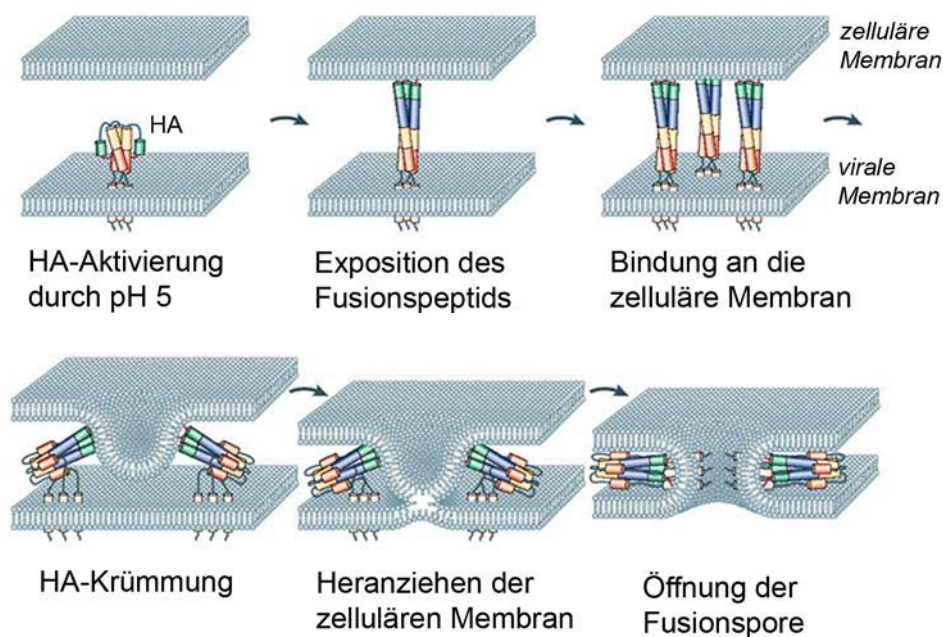
Der Fusion voraus geht die Bindung von HA an Sialinsäure-haltige Oberflächenglykoproteine oder -lipide. Wie alle Fusionsproteine befindet sich HA an der Zelloberfläche in einem metastabilen Zustand, welcher das hydrophobe Fusionspeptid in sich verborgen trägt (Carr et al., 1997; Skehel und Wiley, 2000). Als metastabiler Zustand wird im Folgenden die gespaltene pH-7-Konformation von HA bezeichnet, welche schon in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten worden ist, bei der die Umlagerung in die pH-5-Konformation aber noch nicht stattgefunden hat. Der gespaltenen pH-7-Konformation voraus geht die ungespaltene pH-7-Konformation, in welcher HA noch nicht durch eine Protease in die Untereinheiten gespalten wurde (Abb. 4).



**Abbildung 4: Hämagglutinin-Konformationen.** Dargestellt ist die Ektodomäne eines HA-Trimeres, wobei die globulären Domänen in blau und die fibrösen Domänen in rot dargestellt sind. Gelb ist das Fusionspeptid bzw. die proteolytische Spaltstelle. Nach der Spaltung kommt es zu einer geringfügigen Konformationsänderung, HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> sind dann nur noch über Disulfidbrücken verbunden. Nach der Behandlung mit pH 5 trennen sich die globulären Kopfgruppen, und das Fusionspeptid wird dadurch oben auf dem Trimer exponiert. Nach (Skehel et al., 2001).

Das saure Milieu des Endosoms dient als Aktivierung für die Freisetzung des Fusionspeptids. Dabei kommt es zur Konformationsänderung von der gespaltenen pH-7- in die pH-5-Konformation. Hierfür trennen sich die globulären Kopfgruppen und setzen so HA<sub>2</sub> frei. Dadurch wird das Fusionspeptid oben auf der dreisträngigen „Coiled-coil-Struktur“ exponiert. Diese Position ermöglicht dann die Interaktion mit der Zielmembran (Abb. 4). Weitere Umla-

gerungen bewirken, dass die beiden Enden des HA-Proteins, die die TMD bzw. das Fusionspeptid tragen, eng aneinandergezogen werden und somit nähern sich auch die virale und die endosomale Membran an (Earp et al., 2005). HA induziert durch dieses Prinzip eine Fusion, bei der die jeweilige äußere Lipidschicht der viralen bzw. endosomalen Membran eine Doppelschicht bilden (Abb. 5) (Razinkov et al., 1999). Danieli et al. konnten zeigen, dass es sich bei der HA-vermittelten Fusion um einen kooperativen Prozess handelt, der mindestens 3 bis 4 HA-Trimere benötigt (Danieli et al., 1996), vermutlich weil nur eine Vielzahl von HA-Proteinen genug Energie bereitstellen, um eine Fusionsreaktion zu ermöglichen (Blumenthal et al., 1996). Durch die Fusionspore wird dann das virale Genom in das Zytoplasma entlassen, und das Virus kann mit Hilfe der zellulären Replikationsmaschinerie vermehrt werden. Die Neubildung von HA ist hierbei ein komplexer Ablauf, der im ER und Golgi-Apparat stattfindet.



**Abbildung 5: HA vermittelt die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran.** Der genaue Ablauf ist im Text beschrieben. In Kürze: Nach der Aktivierung mit pH 5 kommt es zu einer Konformationsänderung von HA, was zur Exposition des Fusionspeptids führt. Dieses bindet die zelluläre Membran. Durch weitere Konformationsänderungen ziehen sich die beiden Enden des HA-Trimers wie ein Klappmesser zusammen und leiten damit den Fusionsvorgang ein. Nach (Earp et al., 2005).

### 1.2.2 Proteinbiosynthese, Prozessierung und Transport des Hämagglutinins

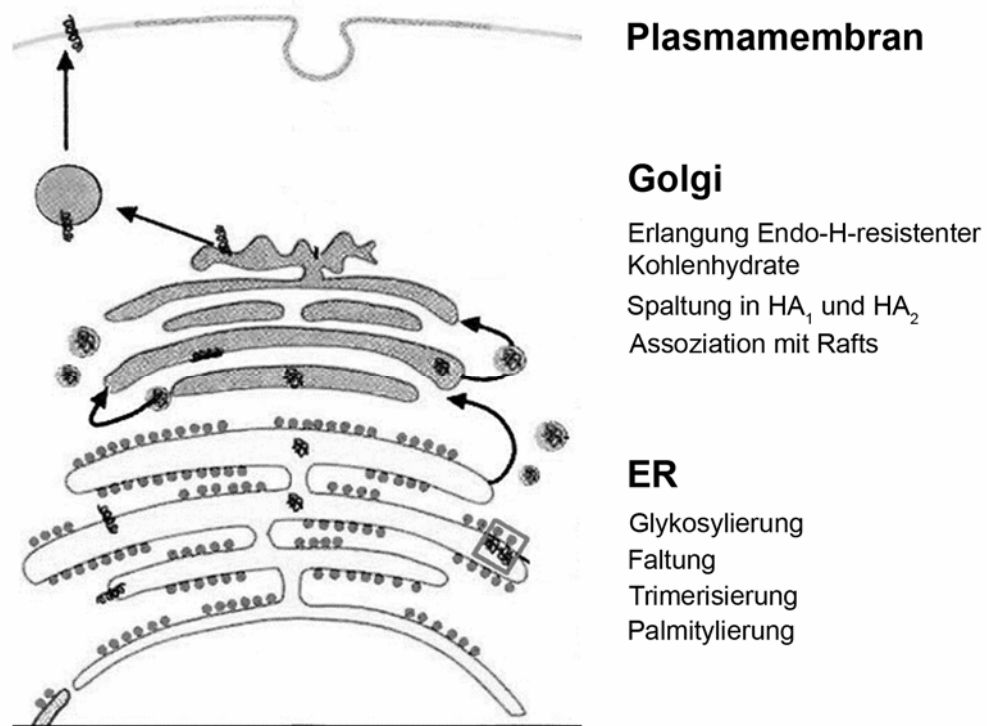
Die Translation von HA findet an ER-gebundenen Ribosomen statt. Hierbei erfolgt die Synthese der Polypeptidkette direkt in das ER hinein. Während der Synthese finden auch gleichzeitig die Faltung des Proteins, die Glykosylierung und vermutlich die Trimerbildung statt (Wilson et al., 1981), ohne die kein Weitertransport in den Golgi-Apparat möglich ist (Copeland et al., 1986; Copeland et al., 1988; Gething et al., 1986) (Abb. 6). Die spätere Untereinheit HA<sub>2</sub> wird zweifach glykosyliert, HA<sub>1</sub> erhält fünf Kohlenhydratreste (Keil et al., 1985).

Weiterführende Prozessierungen der Mannose-reichen Kohlenhydratketten beginnen ebenfalls schon im ER und werden im Golgi fortgesetzt (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Bei dieser Prozessierung entstehen Kohlenhydrat-Seitenketten vom komplexen Typ, das heißt, dass bis zu sechs der neun Mannosemoleküle, die bei der Kernglykosylierung in dem Kohlenhydratgrundgerüst enthalten sind, wieder abgespalten werden und dafür N-Acetylglukosamin, Galaktose und Fukose auf die Kohlenhydratkette übertragen werden. Zwei der sieben Kernglykosylierungen des hier verwendeten HA-Subtyps werden allerdings nicht weiter prozessiert. Man nimmt an, dass diese in der Trimerstruktur eingeschlossen und so für die prozessierenden Enzyme unerreichbar sind (Roberts et al., 1993).

Anhand dieser Glykosylierungen kann der Transport von HA in der Zelle sehr gut untersucht werden, denn nach weiteren Modifikationen der Glykosylierungen im Golgi nennt man diese Kohlenhydratseitenketten auch Endo-H-resistent. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Endoglykosidase-H (Endo-H) nur Mannose-reiche Zuckerseitenketten abspalten kann. Mit Hilfe eines Verdaus mit diesem Enzym kann man also eine Aussage darüber machen, ob das HA-Protein durch das ER und in den medialen Golgi-Apparat transportiert worden ist. Denn bleibt es im ER stecken, so bleiben alle Kohlenhydratketten Endo-H-sensitiv. Als Kontrollenzym kann die Peptid-N-Glykosidase-F (PNGase-F) verwendet werden, da diese alle N-glykosidischen Verbindungen spalten kann und somit alle Glykosylierungen von HA verdaut. Endo-H dagegen verdaut nach einem korrekten Transport zur Plasmamembran nur die beiden Glykosylierungen, die nicht weiter zum komplexen Typ prozessiert wurden. Funktionell sorgen die Glykosylierungen für die Stabilität eines Proteins, haben eine unterstützende Funktion bei der Faltung und schützen das Protein vor Denaturierung und Proteolyse (Roberts et al., 1993).



Eine weitere posttranslationale Modifikation des HA ist die Palmitylierung oder S-Acylierung. Diese erfolgt an den Cysteinen 551, 559 und 562 (Kordyukova et al., 2008), wobei sich die letzten beiden im zytoplasmatischen Schwanz von HA befinden und das erste Cystein in der Transmembranregion (Veit et al., 1991).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des HA-Transports durch die Zelle.** HA wird hierbei in das Lumen des ERs translatiert und erfährt dann zahlreiche post-translationale Modifikationen. Im ER findet die Faltung des Monomers und die Trimerbildung statt. Außerdem wird das Protein hier palmityliert, und es werden Mannose-reiche Kohlenhydratketten angehängt. Im Golgi findet dann die Prozessierung der Kohlenhydrate statt, im TGN die Spaltung in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> und vermutlich die Assoziation mit Rafts. Für die genaue Beschreibung siehe Text. Zur Verfügung gestellt von M. Veit (FU Berlin).

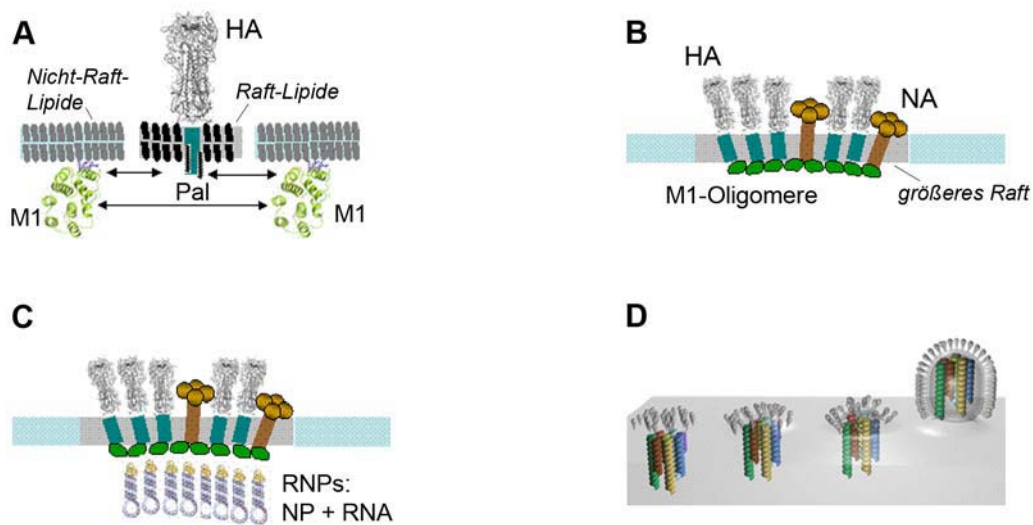
Diese Palmitylierung findet entweder auf dem Transport des Proteins vom ER zum Golgi statt oder im Cis-Golgi (Veit und Schmidt, 2006). Und obwohl es sich bei einer Palmitylierung im Prinzip um einen reversiblen Prozess handelt (Bijlmakers und Marsh, 2003), ist es bei dem HA von Influenzaviren eine stabile post-translationale Modifikation des Proteins (Veit und Schmidt, 1993). Die Funktion der Palmitylierung des Hämagglutinins ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt viele Arbeitsgruppen, die den Einfluss der Palmitylierung auf die Fusionsaktivität von HA untersucht haben. Die Meinungen gehen hierbei bis heute auseinander. Jedoch konnte bei einem Großteil der Untersuchungen gezeigt werden, dass die Fusionspo-

renbildung bzw. deren Stabilität durch das Fehlen der Palmitoylierung beeinflusst wird (Veit und Schmidt, 2006). Ebenfalls nicht eindeutig sind die Ergebnisse bezüglich der Notwendigkeit der Palmitoylierung beim Zusammenbau und der Freisetzung der Viren. Da aber alle HA-Subtypen, die ansonsten wenig Sequenzhomologie aufweisen, mindestens drei acylierte Cysteine besitzen, geht man von einer für die Virusvermehrung essentiellen Funktion der Fettsäuren aus.

Beim weiteren Transport durch das TGN werden dann einige Subtypen von HA, unter anderem der hier verwendete Subtyp H7, proteolytisch durch zelleigene Proteasen wie Furin in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten und vermutlich in Rafts eingebaut (Skibbens et al., 1989; Whittaker, 2001). Bei dieser Raft-Inkorporation könnten die Palmitatreste von HA eine wichtige Rolle spielen, denn vor allem bei der multiplen Acylierung soll es sich um ein weit verbreitetes Raft-Signal handeln (siehe Kapitel 1.3). Dennoch werden nicht alle acylierten Proteine in Rafts eingebaut (Melkonian et al., 1999). Man geht in diesem Fall davon aus, dass sich die dann schon fertig gebildeten Raft-Komplexe vom TGN als Vesikel abschnüren und zur Plasmamembran transportiert werden, mit der sie dann verschmelzen.

### 1.2.3 Zusammenbau und Freisetzung von Influenzaviren

Für den Zusammenbau der Influenzaviren geht man davon aus, dass sowohl HA als auch NA eine intrinsische Affinität für Membran-Rafts (siehe Kapitel 1.3) besitzen und somit direkt in diese eingelagert werden können (Barman und Nayak, 2000; Skibbens et al., 1989) (Abb. 7 A). M1 hingegen bindet zwar an die Membran, ist bei der Extraktion von Rafts mit Triton X-100 aber Detergens-löslich. Wird es allerdings zusammen mit einem der viralen Glykoproteine in Zellen exprimiert, wird es Detergens-unlöslich (Ali et al., 2000). Demnach geht man davon aus, dass HA und NA die Membran- und speziell die Raft-Bindung von M1 stimulieren und so den Viruszusammenbau erleichtern (Enami und Enami, 1996). Da M1 große Oligomere bildet, können so viele kleine Rafts zu einem größeren zusammengeschlossen werden (Abb. 7 B). Denn geht man bei einem Raft von einer durchschnittlichen Größe von 5–50 nm aus, würde dies nicht ausreichend sein, um die Hülle eines Virus auszubilden, welches einen Durchmesser von mindestens 80 nm besitzt. Dies befürwortet die Hypothese, dass es bei dem Zusammenbau neuer Viren zu einer Verschmelzung vieler Rafts kommt (Suomalainen, 2002). Hierbei werden die zellulären Raft-Proteine selektiv aus diesen Bereichen verdrängt. Denn bei vielen Viren resultiert die Analyse der chemischen Zusammensetz-



**Abbildung 7: Zusammenbau von Influenzaviren in Membran-Rafts.** **A:** HA und NA interagieren mit dem M1-Protein, welches dadurch ebenfalls bei Membran-Rafts lokalisiert wird. **B:** M1 führt durch die Bildung von Oligomeren zum Verschmelzen mehrerer kleiner Rafts zu einem größeren. **C:** Anschließend lagert sich das virale Genom an die M1-Oligomere an. **D:** Nachdem alle viralen Komponenten an der Membran lokalisiert sind, knospen sich neue Viren von der Zelle ab.

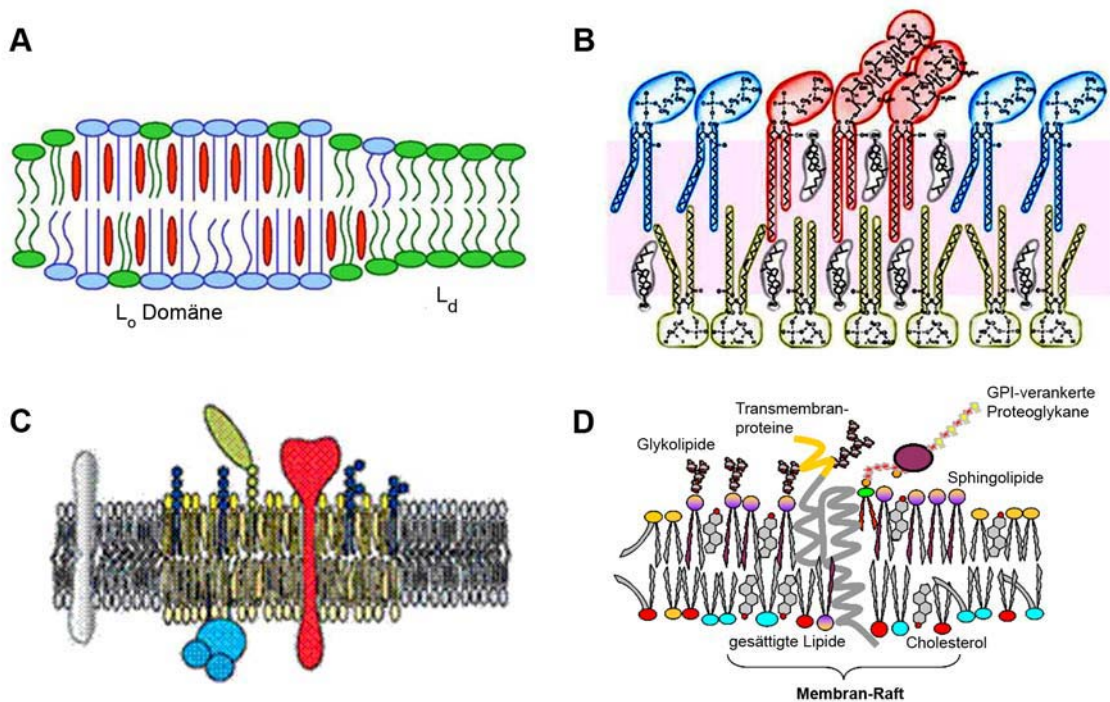
ung der viralen Hüllmembran in einem Anteil an Wirtszellproteinen, der bei nur 1% liegt (Briggs et al., 2003). Nach dem Zusammfügen vieler Rafts binden die RNPs an die M1-Proteine (Abb. 7 C). Wenn dann alle Viruspartikel zusammengelagert sind, schnürt sich das neu gebildete Virion von der Plasmamembran ab (Abb. 7 D). Wie genau kontrolliert wird, dass auch alle acht RNP-Komplexe vorhanden sind, ist noch ungeklärt. Man geht aber von einem spezifischen „Verpackungsmodell“ aus, so dass von jedem RNA-Segment eines in das neu gebildete Virion eingebaut wird (Nayak et al., 2004).

### 1.3 Membran-Rafts

Die Hypothesen zur Struktur der Zellmembran wurden 1972 im Flüssig-Mosaik-Modell zusammengefasst. Dabei ging man davon aus, dass es sich bei der Lipiddoppelschicht um eine zweidimensionale Lösung handelt, in welcher alle Lipide homogen verteilt vorliegen. Diese Lipide, aber auch integrale Membranproteine, können dabei frei in der Membran diffundieren, sofern dies nicht durch spezifische Wechselwirkungen verhindert wird. Die Lipide besitzen darüber hinaus die Möglichkeit, auch transversal zu diffundieren; das bedeutet, es findet ein „Flip-Flop“ zwischen der äußeren und der inneren Lipidschicht statt, welcher aber viel langsamer vonstatten geht als die laterale Diffusion. Man ging weiterhin davon aus, dass diese homogene Lipiddoppelschicht nur einen geringen Einfluss auf die Funktion der integralen Membranproteine ausübt (Singer und Nicolson, 1972).

Später fand man heraus, dass eine Asymmetrie der Lipidzusammensetzung zwischen der inneren und der äußeren Lipidschicht besteht und somit die Lipide nicht wie bisher angenommen homogen über die Membran verteilt sind (Pomorski et al., 2001). Hierbei kommen die Lipide Sphingomyelin und Phosphatidylcholin vor allem in der äußeren und Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin vor allem in der inneren Lipidschicht der Membran vor (Zachowski, 1993).

Studien an polarisierten Epithelzellen haben darüber hinaus Hinweise geliefert, dass auch innerhalb einer Lipidschicht keine symmetrische Lipidverteilung vorliegt. Vielmehr sah es so aus, als würden sich dynamische Zusammenschlüsse einzelner Lipide in der äußeren Lipidschicht der Membran bilden. Anhand dieser Befunde wurde 1988 die Raft-Hypothese formuliert (Simons und van Meer, 1988). Die Definition von Membran-Rafts besagt, dass es sich dabei um kleine (5–50 nm), sehr dynamische, Sterol- und Sphingolipid-reiche Domänen mit fluktuierender Größe und Zusammensetzung handelt (Pike, 2006). Die äußere Raft-Membran besteht dabei vor allem aus Cholesterin und Sphingolipiden. Die innere Raft-Membran setzt sich vermutlich aus Cholesterin und Phospholipiden mit gesättigten Fettsäuren zusammen, wobei noch nicht endgültig geklärt ist, wie die beiden Raft-Domänen miteinander verbunden sind (Simons und Ehehalt, 2002). Membran-Rafts werden dabei auch oft als „liquid-ordered“ bezeichnet, da sie durch das Zusammenwirken von Lipiden mit nicht-geknickten Fettsäureresten und Cholesterin eine sehr geordnete, dicht gepackte Struktur ergeben (Abb. 8 A, B). Eine der wichtigsten Eigenschaften von Rafts besteht darin, bestimmte Proteine einzubauen und andere auszuschließen (Abb. 8 C, D) (Simons und Toomre, 2000).



**Abbildung 8: Verschiedene Membran-Raft-Modelle.** **A:** Schematische Darstellung von Raft- und Nicht-Raft-Bereichen. Die rote Ellipse symbolisiert Cholesterolin. Die blauen und grünen Lipide sollen zeigen, dass Raft-integrierte Lipide meistens auch länger sind als Nicht-Raft-Lipide. **B:** Detaillierte Darstellung eines Rafts **C, D:** Annahmen, wie Membranproteine in Membran-Rafts eingelagert und mit diesen assoziiert sein können.

Die Größenvariabilität der Rafts wird vor allem dadurch erklärt, dass kleine Rafts manchmal stabilisiert werden und dabei dann durch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen größere Plattformen bilden (Jacobson und Dietrich, 1999; Pike, 2006). Dies geschieht wahrscheinlich vor allem dann, wenn die Raft-Struktur als funktionelle Domäne benötigt wird (Mayor und Rao, 2004). Es ist dabei sehr wahrscheinlich, dass auch das Zytoskelett die Membran-Rafts beeinflusst oder unterstützt, denn die Mikrofilamente sind mit der inneren Membranlipidschicht verbunden und bilden dabei Zytoskelettkompartimente im Rahmen von 30 bis 250 nm aus. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Aktin-Filamente mit bekannten Raft-Markern koassoziiieren. Rafts können so zum Beispiel durch dieses engmaschige Netz stabilisiert werden, oder mehrere Rafts können innerhalb eines Kompartiments miteinander verschmelzen. Darüber hinaus handelt es sich beim Zytoskelett um ein dynamisches System, das sich aufgrund extrazellulärer Signale verändern kann und so eventuell Einfluss nimmt auf die Größe und Verteilung von Membran-Rafts (Chichili und Rodgers, 2007; Kusumi et al., 2004; Zurzolo et al., 2003).

Rafts kommen aufgrund ihrer Zusammensetzung vor allem in der Plasmamembran, den späten Golgi-Kompartimenten und in endozytotischen Membranen vor und dienen als mobile Plattformen für spezifische Proteine innerhalb dieser Membranen (Ikonen, 2001; Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001). Außerdem sind Rafts bei zahlreichen zellulären Prozessen wie Signaltransduktionskaskaden und Endozytose beteiligt (Alonso und Millan, 2001; Simons und Toomre, 2000). Im Hinblick auf Virusinfektionen sind Rafts sowohl beim Viruseintritt als auch beim Zusammenbau und der Freisetzung bestimmter Viren beteiligt (van der Goot und Harder, 2001). Vor allem bei Viren wie das Humane Immundefizienz-Virus, Ebola-, Marburg- oder Influenzaviren wurde in zahlreiche Studien gezeigt, dass Membran-Rafts am Viruszusammenbau dieser Viren beteiligt sind (Bavari et al., 2002; Lindwasser und Resh, 2001; Ono und Freed, 2001; Pickl et al., 2001; Scheiffele et al., 1999; Vincent et al., 2000).

### 1.3.1 Methoden zur Untersuchung von Membran-Rafts

Bis heute ist es sehr schwierig, Untersuchungen an Membran-Rafts der inneren oder äußeren Lipidschicht der Membran, durchzuführen, da sie zu klein sind, um mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden zu können. In den ersten Jahren wurden alle Raft-betreffenden Untersuchungen biochemisch mit der Triton-Extraktions-Methode durchgeführt. Hierbei werden durch Inkubation von Zelllysaten mit Triton X-100 Detergens-resistente Membranen (DRMs) erzeugt, die sich im Sucrosegradienten von Detergens-löslichen Membranen trennen lassen. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass die DRMs die Protein- und Lipidzusammensetzung von Membran-Rafts widerspiegeln (Melkonian et al., 1999). Eines der ersten Proteine, dessen Vorhandensein in DRMs nachgewiesen wurde, war das Influenzavirus-Hämagglutinin (Fiedler et al., 1993). Weitere Experimente haben gezeigt, dass insbesondere die Palmitylierung von HA und dessen Transmembranregion wichtig für die Inkorporation von HA in DRMs sind (Melkonian et al., 1999; Scheiffele et al., 1997). Untersuchungen an vielen weiteren Proteinen haben dazu geführt, dass man von drei wichtigen Raft-Signalen ausgehen kann: die Verankerung mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker (Brown und Rose, 1992; Schroeder et al., 1998), die doppelte Palmitylierung eines Proteins (Milligan et al., 1995; Shenoy-Scaria et al., 1994) sowie die N-terminale Acylierung eines Proteins an dem Met-Gly-Cys-Motiv, wobei Glycin myristyliert und Cystein palmityliert wird (Arni et al., 1998).

Vor wenigen Jahren wurde dann aufgrund einer Reihe von neuen Erkenntnissen die Gleichsetzung von DRMs und Membran-Rafts in Frage gestellt (de Almeida et al., 2003; Heerklotz, 2002; Mayor und Rao, 2004; Munro, 2003). Unter anderem konnte anhand der Extraktion aus Liposomen gezeigt werden, dass die Proteinzusammensetzung der DRMs von dem Detergens/Protein-Verhältnis abhängt, welches für die Bildung von Liposomen verwendet wurde (Schuck et al., 2003). Außerdem wird durch das Absenken der Temperatur auf 4 °C die Bildung von Rafts erst induziert (Edidin, 2003; Jacobson et al., 2007; Mayor und Rao, 2004; Mukherjee und Maxfield, 2004; Simons und Vaz, 2004). Einige Forschergruppen gehen sogar so weit zu sagen, dass sich die DRMs von Rafts sowohl in Größe, Zusammensetzung und Struktur als auch eventuell sogar im Vorhandensein unterscheiden (Heerklotz, 2002).

Mittlerweile ist es auch fraglich, ob der Einsatz von Reagenzien wie Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, welches der Zelle Cholesterin entzieht, nicht einfach dadurch die Raft-Affinität eines Proteins beeinflusst, dass eine der vielen Funktionen von Cholesterin in der Membran gestört ist, und nicht, wie bis dahin angenommen, dadurch, dass nur die Raft-Struktur beeinträchtigt oder aufgelöst wird (Munro, 2003). Weitere Studien gehen heute davon aus, dass sich stabile Rafts erst ausbilden, nachdem nicht-stabile Raft-Vorläufer durch „Crosslinking“ stabilisiert worden sind (Subczynski und Kusumi, 2003). Somit ist es wichtig, Rafts so zu untersuchen, dass sie selbst so unbeeinflusst wie möglich bleiben. Dies wurde schon mit neueren Methoden wie FRAP oder FPALM, siehe Kapitel 1.4, versucht. Jedoch sind die Ergebnisse einiger dieser Arbeiten widersprüchlich (Kenworthy et al., 2004; Shvartsman et al., 2003). FRET dagegen ist als eine sinnvolle Methode anerkannt, um Rafts in lebenden Zellen zu untersuchen (Mayor und Rao, 2004; Vogel et al., 2006).

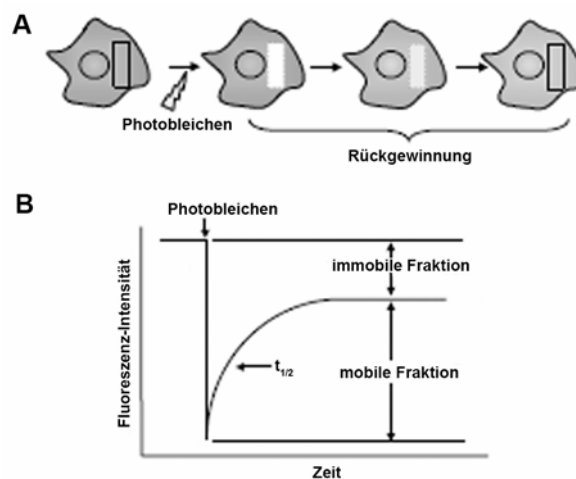
## **1.4 Fluoreszenzmikroskopische Methoden zur Untersuchung der Membranassoziationseigenschaften von HA im lebenden System**

### **1.4.1 FRAP**

FRAP (engl. für Fluorescence Recovery After Photobleaching) beschreibt die Messung der Rückgewinnung von Fluoreszenz in einem mikroskopischen Bildausschnitt nach vorherigem Ausbleichen der Fluoreszenz in diesem Bereich (Abb. 9 A). Dadurch können die Mobilität

und die Diffusionsgeschwindigkeit der untersuchten Proteine bestimmt werden. Hierfür wird ein fluoreszierender Bereich ausgewählt, die Fluoreszenzintensität in diesem Bereich gemessen und dann die Fluoreszenz durch einen kurzen Laserpuls nur an diesem Ort ausgebleicht. Bei diesem Photobleichen gehen die fluoreszierenden Moleküle irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand über. Anschließend wird die Intensität in diesem Bildausschnitt für eine bestimmte Zeitspanne, im Sekunden- bis Minutenbereich, weiter vermessen, wodurch detektiert wird, wie lange noch fluoreszierende Proteine in diesen Bereich einwandern. Aus der hierbei gewonnenen Intensitäts-Rückgewinnungs-kurve lässt sich dann die Zeit bis zur halbmaximalen Rückgewinnung, die zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten benötigt wird, und dazu der prozentuale Anteil mobiler Proteine bestimmen (Abb. 9 B).

Für das Hämagglutinin wurden schon einige FRAP-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei sind die Resultate jedoch sehr widersprüchlich. Zum einen konnte gezeigt werden, dass HA, welches in Rafts eingebaut wird, langsamer in der Membran diffundiert als eine HA-Mutante, die weniger in Rafts vorkommt. Außerdem wurde dabei festgestellt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit der Raft-Proteine vom Vorhandensein von Cholesterin abhängig ist (Shvartsman et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass der Cholesterinentzug aus der Membran sowohl Raft- als auch Nicht-Raft-Proteine beeinflusst, und auch beim Vergleich der Diffusionsgeschwindigkeiten konnte keine Verbindung zwischen der Raft-Inkorporation eines Proteins und dessen Diffusionseigenschaften nachgewiesen werden. Dies wurde mit der Annahme begründet, dass auch Raft-Proteine frei in der Membran beweglich sein sollen (Kenworthy et al., 2004).

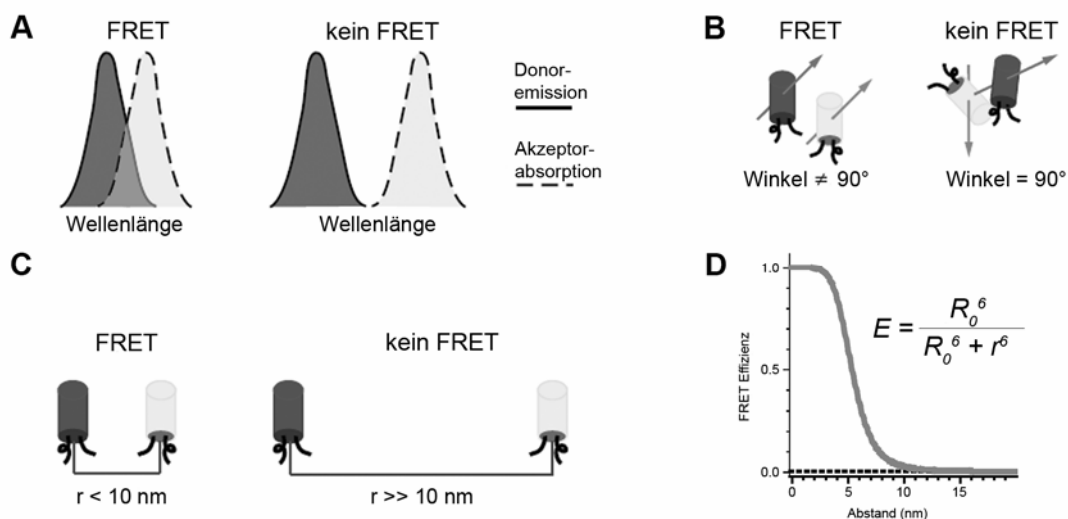




**Abbildung 9: FRAP dient der Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit und der Mobilität eines Proteins.** **A:** Eine Region der Zelle wird ausgewählt, um spezifisch dort die Fluorophore irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand zu überführen. Dann wird bei geringer Laserintensität verfolgt, wie schnell fluoreszierende Moleküle in diesen Bereich einwandern. **B:** Darstellung einer Modellkurve für FRAP. Zu Beginn wird die Fluoreszenzintensität in dem ausgewählten Bereich gemessen und dann ein Großteil der Fluorophore zerstört. Über einen Zeitraum von wenigen Minuten wird dann die Intensitätssteigerung in diesem Bereich (durch Einwanderung anderer Moleküle) gemessen und daraus die Zeit berechnet, in der 50% der endgültigen Intensität erreicht wurde. Weiterhin kann durch den Vergleich der Intensität vor dem Bleichen und am Ende der Messung der Anteil der Moleküle einer Population bestimmt werden, die sich in der Membran bewegen können. Nach (Goodwin und Kenworthy, 2005).

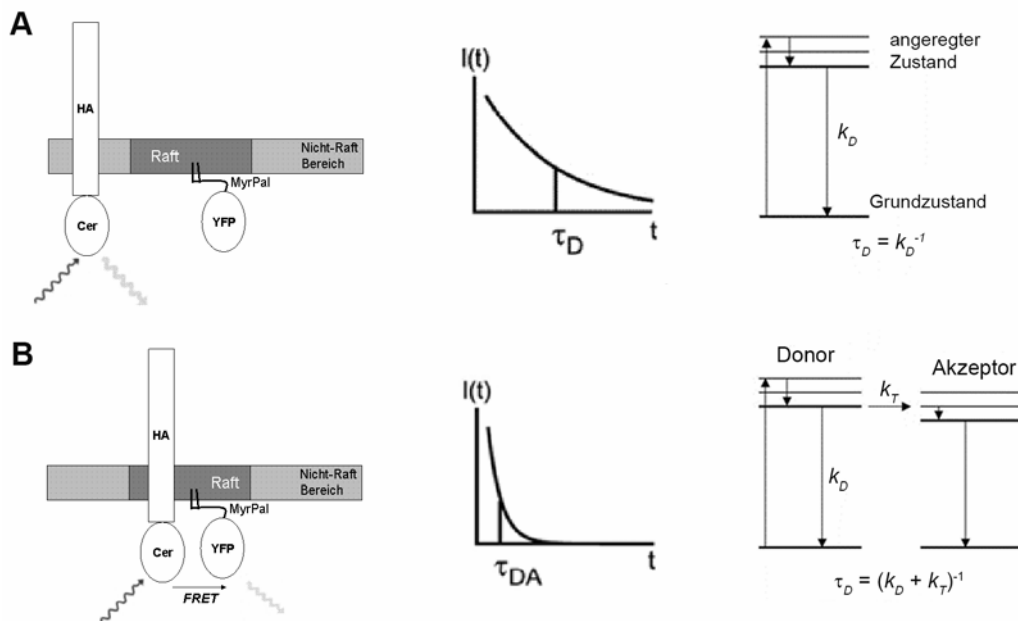
#### 1.4.2 FLIM-FRET

Der von Theodor Förster 1946 beschriebene Prozess des strahlungsfreien Energieübergangs von einem fluoreszierenden Molekül auf ein anderes wird Försters Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt (Förster, 1948). Hierbei wird Energie von einem Donorfluorophor auf ein Akzeptorfluorophor übertragen. Voraussetzung ist, dass beide Fluorophore in räumlicher Nähe zueinander vorkommen, das heißt, dass der Abstand zwischen den beiden weniger als 10 nm beträgt (Abb. 10 C, D). Außerdem muss sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überschneiden (Abb. 10 A), und das Emissionsdipol des Donors darf nicht im rechten Winkel zum Absorptionsdipol des Akzeptors stehen (Abb. 10 B) (Vogel et al., 2006).



**Abbildung 10: Bedingungen, damit Energietransfer von einem Donor auf einen Akzeptor stattfinden kann.** **A:** Das Emissionsspektrum des Donors muss sich mit Absorptionsspektrum des Akzeptors überschneiden. **B:** Die Dipole von Donor und Akzeptor dürfen nicht im rechten Winkel zueinander stehen. **C:** Der Abstand von Donor und Akzeptor darf maximal 10 nm betragen. **D:** Beispielhaft ist die Abhängigkeit der FRET-Effizienz ( $E$ ) vom Abstand ( $r$ ) des Donor-Akzeptor-Paares aufgezeichnet. Bei diesem Paar beträgt der Förster-Radius  $R_0$  54 nm, was auch ungefähr dem in dieser Arbeit verwendeten FRET-Paar Cerulean/YFP entspricht. Nach (Vogel et al., 2006).

FRET kann für eine Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt werden, zum Beispiel um Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen eines Proteins oder proteolytische Prozesse besser untersuchen zu können (Piston und Kremers, 2007). Dabei gibt es eine Vielzahl von experimentellen Methoden, um FRET zu messen (Jares-Erijman und Jovin, 2003). Hierzu gehören: das Photobleichen des Akzeptors, die spektrale Bildaufnahme, die sensibilisierte Emission, die Messung der Lebenszeit des Fluorophors (FLIM) und Polarisation-Anisotropie-Messungen.



**Abbildung 11: FRET führt zu einer Reduktion der Donor-Lebenszeit.** **A:** Schematische Darstellung für die Lebenszeit eines Donorfluorophors wie HA-Cerulean, wenn kein FRET stattfindet. Cerulean wird angeregt und kehrt nach der Emission eines Photons wieder in den Grundzustand zurück. **B:** Wenn ein Energietransfer von Cerulean auf YFP stattfindet, so verkürzt sich die Zeit, die Cerulean im angeregten Zustand verbleibt, und es kehrt schneller in den Grundzustand zurück. Somit wird die Lebenszeit geringer.  $\tau_D$  = Halbwertszeit der Lebenszeit des Donors,  $\tau_{DA}$  = Lebenszeit des Donors, wenn Energietransfer auf den Akzeptor stattfindet,  $k_D$  = Fluoreszenzabklingrate,  $k_T$  = Energietransferrate,  $I(t)$  = Intensität,  $t$  = Zeit.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode wird FLIM-FRET genannt und basiert auf der Messung der Lebenszeit des Donors in An- bzw. Abwesenheit des Akzeptors (Abb. 11). Dabei beschreibt die Lebenszeit eines Moleküls die Zeit, die es im angeregten Zustand verbleibt, bevor es ein Photon emittiert und in den Grundzustand zurückkehrt (Chen et al., 2003). Findet allerdings Energietransfer auf ein Akzeptormolekül statt, so wird die Zeit, die sich das Donormolekül im angeregten Zustand befindet, verkürzt, das bedeutet, die Lebenszeit nimmt ab. Diese verkürzte Lebenszeit wird dann mit der Lebenszeit des Donors verglichen, wenn dieser allein vorliegt, daraus kann dann die FRET-Effizienz berechnet werden (siehe Material und Methoden).

Die FRET-Effizienz (FRET E%) beschreibt dabei den Anteil der Energie des angeregten Donors, der auf den Akzeptor übertragen wird. FRET E% ist dabei abhängig vom Abstand der beiden Fluorophore: je größer der Abstand, desto geringer FRET E% (Abb. 10 D) (van Roesel und Brand, 2002). Bei der Evaluierung verschiedener Methoden zur Messung von FRET sind die einzigen Kritikpunkte an FLIM-FRET die hohen Kosten, die für spezielle Ausrüstung zur Messung der Lebenszeit anfallen, und die Zeit, die es benötigt, die Daten zu generieren (Piston und Kremers, 2007; Vogel et al., 2006; Wallrabe und Periasamy, 2005). Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den sonst gebräuchlichen Methoden ist, dass sie unabhängig ist von der Konzentration der Donor- und Akzeptorproteine sowie von der direkten Anregung des Akzeptors durch den Donoranregungslaser und der teilweisen Detektion der Emission von Donormolekülen im Akzeptorkanal (Chen et al., 2003; Piston und Kremers, 2007). Somit handelt es sich bei FLIM-FRET um eine sehr zuverlässige Methode, um den Energietransfer von einem Donor auf ein Akzeptormolekül zu untersuchen.

Bisherige FRET-basierende Untersuchungen von Rafts der inneren Lipidschicht der Membran wurden vor allem mit Hilfe von Akzeptor-Photobleichungs-Experimenten durchgeführt. Dabei wurde unter anderem untersucht, inwiefern die Membranverankerung eines Proteins Einfluss auf seine Affinität zu Rafts besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass zweifach acylierte Proteine eine hohe Raft-Affinität aufweisen, falls es sich bei der Acylierung um Palmitat oder Palmitat und Myristat handelt. Dagegen kommen Proteine, die über Prenylverbindungen in der Membran verankert sind, nicht in Rafts vor (Zacharias et al., 2002). Allerdings ist das Akzeptor-Photobleichen ungeeignet für die Messung in lebenden Zellen (Wallrabe und Periasamy, 2005), denn die Zellen müssen fixiert werden, was wie bei der Extraktion von DRMs zu einem falschen Ergebnis führt, da es zu Klusterbildungen durch die Fixierung mit Parafor-

maldehyd kommen kann (Kusumi und Suzuki, 2005; Mayor et al., 1994). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit FLIM-FRET verwendet, eine Methode, die auf Messungen in lebenden Zellen ausgerichtet ist.

## **2 Ziel der Arbeit**

Eine Eigenschaft der Raftkomponenten ist, dass sie bei einer Extraktion mit kalten, nicht-ionischen Detergenzien, wie Triton X-100, unlöslich sind. Aus diesem Grund wurden sie mit den Detergens-resistenten Membranen (DRMs) gleichgesetzt; alle bis dahin gewonnen Erkenntnisse wurden einfach auf Membran-Rafts und damit das lebende System übertragen. Diese Gleichsetzung ist mittlerweile jedoch sehr umstritten. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Raft-Affinität von HA in lebenden Zellen untersucht werden. Hierbei sollte eine neue, fluoreszenzmikroskopische Methode verwendet werden, welche weder Rafts noch HA selbst beeinflusst, wie es sonst zum Beispiel bei „Crosslinking“-Experimenten der Fall sein kann. Darüber hinaus sollten die bisher bekannten Signale für die Inkorporation von HA in DRMs auf ihre Relevanz im lebenden System überprüft werden. Auch der Zusammenhang von Membran-Rafts und dem Zytoskelett sollte dabei betrachtet werden.

Weiterhin belegen und widerlegen verschiedenste Studien eine Verbindung zwischen der Raft-Affinität eines Proteins und seiner Diffusionsgeschwindigkeit und Mobilität in der Membran. Auch diese Fragestellung sollte im Hinblick auf HA fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte ferner geprüft werden, inwiefern die Membranfusion-auslösende Konformationsänderung von HA einen Einfluss auf dessen Affinität zu Membran-Rafts besitzt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das Fusionspeptid von HA keine Affinität zu DRMs besitzt. In dieser Arbeit sollte die Raft-Affinität von intrazellulär gespaltenem HA mit ungespaltenem bzw. extrazellulär gespaltenem HA verglichen werden, um herauszufinden, ob die Konformation von HA eine Rolle bei der Integration in Rafts spielt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Frage beschäftigen, ob die Transmembrandomäne, und hier im Besonderen deren erste drei Aminosäuren, einen Einfluss auf die Prozessierungsgeschwindigkeit bzw. den Transport von HA ausüben. Diese Fragestellung sollte biochemisch anhand eines Vergleichs von Wildtyp und Mutanten bearbeitet werden.

### 3 Material

#### 3.1 Biologisches Material

##### 3.1.1 Zellen

CHO-K1 (Eierstockzellen des chinesischen Hamsters [engl. für Chinese Hamster Ovary Cells])

MDCK II (Nierenzellen des Hundes [engl. für Madin-Darby Canine Kidney Cells])

##### 3.1.2 Bakterien

*Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene)

*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac* [*F'* *proAB lacI<sup>q</sup> ΔM15 Tn10*]

#### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

##### 3.2.1 Zellkulturreagenzien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM ohne Phenolrot, MEM (Minimal Essential Medium) mit EBSS ohne L-Glutamin, L-Cystein, L-Methionin (**PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland**)

PBS, PBS mit Calcium und Magnesium, Trypsin-EDTA (**Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien**)

FCS (fötales Kälberserum [engl. für Fetal Calf Serum]) (**Perbio, Bonn, Deutschland**)

L-Glutamin (**Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland**)

##### 3.2.2 Chemikalien

AccuTaq-Polymerase, APS, Cytochalasin D, EDTA, Filipin III, Jodacetamid, Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Na-Desoxycholat (DOC), Protein-A-Sepharose, Salicylat, Soybean (Trypsin-

Inhibitor), TEMED, Trypsin DPCC-behandelt, Tween-20 (**Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland**)

Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese 30), DMSO, Ethanol (vergällt), Essigsäure, Ethidiumbromid, Glycerin, Glycin, HEPES, Kanamycinsulfat, Methanol, NaCl, NaOH, Magnesiumchlorid, SDS (Na-Dodecylsulfat), Trichloressigsäure (TCA), Tris (**Roth, Karlsruhe, Deutschland**)

Agar, Agarose, Lipofectamine 2000, YT-Medium (**Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland**)

Bromphenolblau, Ethanol, Kaliumhydrogenphosphat, Latrunculin B, Natriumhydrogenphosphat (**Merck, Darmstadt, Deutschland**)

G418, Magermilchpulver, PMSF, Sucrose (**Applichem, Darmstadt, Deutschland**)

Coomassie Brilliant Blue G-250,  $\beta$ -Mercaptoethanol, MES, Triton X-100 (**Serva, Heidelberg, Deutschland**)

dNTP-Mix (**Stratagene, La Jolla, CA, USA**)

ECL plus Western Blotting Detection System (**Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland**)

$^3\text{H}$ -Palmitat: MT 845 Palmitic acid [ $9,10\text{-}^3\text{H}$ ] (**Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland**)

peqGold Protein Marker, peqGold Prestained Protein Marker (**Peqlab, Erlangen, Deutschland**)

SeaPlaque Agarose (**Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien**)

Smart Ladder (**Eurogentec, Köln, Deutschland**)

$^{35}\text{S}$ -Methionin (Tran $^{35}\text{S}$ -Label) (**MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland**)

### 3.2.3 Enzyme und Antikörper

#### **Restriktionsenzyme:**

*AgeI*, *BglII*, *DraIII*, *NheI*, *SacII*

**Glycosidasen:**

Endo-H, PNGase-F

T4-DNA-Ligase, Quick Ligase, Alkalische Phosphatase (CIP), alle Restriktionsenzyme, alle Glycosidasen (**New England BioLabs, Schwalbach/Taunus, Deutschland**)

**Antikörper:**

anti-GFP (**Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland**)

anti-rabbit HRP-konjugiert (**Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland**)

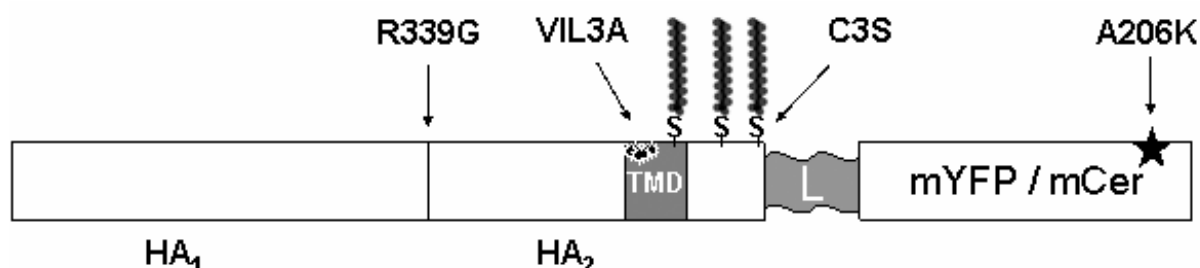
anti-KP-Antiserum (**zur Verfügung gestellt von Prof. Klenk, Institut für Virologie, Universität Marburg, Deutschland**)

### 3.2.4 Plasmide und Oligonukleotide

Es wurden die Plasmide pEYFP-N1 (Invitrogen) und pECerulean-N1 (Rizzo et al., 2004) verwendet. Diese Plasmide enthalten eine multiple Klonierungssequenz vor dem N-Terminus des Fluorophors, in die die Sequenzen für die verschiedenen (in dieser Arbeit verwendeten) HA-Versionen sowie die Raft-Marker einkloniert wurden. Bei HA handelt es sich um den H7-Subtyp von A/FPV/Rostock/34 (H7N1) und die daraus resultierende Palmitylierungsmutante mit den Mutationen C551S, C559S und C562S (Veit et al., 1991). Jede klonierte Sequenz von HA oder den Raft-Markern wurde sowohl in pEYFP als auch in pECerulean eingefügt. Für die Klonierungen wurden die unten aufgeführten, von Invitrogen synthetisierten Oligonukleotide eingesetzt. Die Restriktionsschnittstelle ist jeweils fett und unterstrichen hervorgehoben. Im Fall von AB-PCR Reverse setzt der Primer nach der *DraIII*-Schnittstelle an und enthält sie selbst nicht, aber sie wird trotzdem synthetisiert (Abb. 13 AB-PCR). Bei der AB-PCR wurde für die HA-Konstrukte der HA-„Forward Primer“ als Primer für die Schnittstelle vor dem Konstrukt verwendet. Bei Gap43 und MyrPal wurde hier der AB-PCR-„Forward Primer“ eingesetzt. Eine Übersicht über die Konstrukte und die zugehörigen Primer ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Hierbei wurde jeweils nur das YFP-Konstrukt angegeben, für die Klonierung des Cerulean-Konstrukts wurde jeweils die fertige HA-Mutante bzw. das Raft-Marker-Oligonukleotid mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *SacII* bzw. *SacII* und *AgeI* in den Cerulean-Vektor einkloniert. Das m im Vektornamen steht für die Monomerisierungsmutation



A206K und wurde in der weiteren Arbeit zur Vereinfachung des Namens weggelassen. Abbildung 12 zeigt ein fluoreszenzmarkiertes HA-Konstrukt mit den eingeführten Mutationen.



**Abbildung 12: HA-Linker-Fluorophor-Schema.** L steht für die verschiedenen Linker, die getestet wurden (siehe Ergebnisse). Weiterhin werden die Mutationen ausgewiesen, die zusammen oder einzeln in den Konstrukten vorkommen. Die Mutation A206K wurde in jedem Konstrukt eingeführt und verhindert die Dimerisierung der Fluorophore. VIL3A symbolisiert den Austausch der ersten drei Aminosäuren der TMD durch Alanin. Bei C3S wurden drei Cysteine in der Transmembranregion bzw. am C-Terminus durch Serine ersetzt, und somit wird die Palmitoylierung des Proteins verhindert. R339G symbolisiert die Mutation des gespaltenen Wildtyps zur ungespaltenen Form durch Mutation der polybasischen Schnittstelle, sodass es nicht mehr intrazellulär von Furin gespalten werden kann. HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> sind die beiden HA-Untereinheiten, die nach Spaltung des Proteins durch Disulfidbrücken verbunden sind.

#### Gap43 Forward (*SacII*, *AgeI*)

5'GGGCCGCGGATGCTGTGCTGTATGAGAAGAACCAAACAGGTTGAAAAGAATGA  
TGAGGACCAACCGGTCAAA 3'

#### Gap43 Reverse (*SacII*, *AgeI*)

5'TTTGACCGGTTGGTCCTCATCATTCTTTTCAACCTGTTTGGTTCTTCTCATACAGC  
ACAGCATCCGCGGCCC 3'

#### MyrPal Forward (*SacII*, *AgeI*)

5'GGGCCGCGGACCATGGGATGTATTAAATCAAAAAGGAAAGACAATCTCAATGAC  
GATGAACCGGTCCCC 3'

#### MyrPal Reverse (*SacII*, *AgeI*)

5'GGGGACCGGTTCATCGTCATTGAGATTGTCTTTCCTTTTGGATTTAATACATCCCA  
TGGTCCGCGGCCC 3'

#### HA Forward (*BglII*)

5'CTCAGATCTCATGAACACTCAAATCCTGGTTTTTC 3'

#### HA-K Reverse (*AgeI*)

5'TTTGACCGGTGGTGGCAGCAGATCTTTTATACAAATAGTGCACCG 3'

**HA-P Reverse (*Sac*II)**5'GACCCGCGGTATACAAATAGTGCACCG 3'**HA-L Reverse (*Sac*II)**5'GACCCGCGGAGCTTCAGGCCGGAGTATACAAATAGTGCACCG 3'**HA-C3S-P Reverse (*Sac*II)**5'GACCCGCGGTATAGAAATAGTGGACCG 3'**HA-C3S-L Reverse (*Sac*II)**5'GACCCGCGGAGCTTCAGGCCGGAGTATAGAAATAGTGGACCG 3'**A206K Forward**

5'GGGGTCTTTGCTCAGTTTGGACTGGTAGCTCAG 3'

**A206K Reverse**

5'CTGAGCTACCAGTCCAAACTGAGCAAAGACCCC 3'

**R339G Forward**

5'GAACCTTCCAAAAAAGGCCAAAAAAGAGGCCTG 3'

**R339G Reverse**

5'CAGGCCTCTTTTTTGCCTTTTTTGGGAAGGTTC 3'

**VIL3A Forward**

5'GGCTACAAAGATGCTGCAGCATGGTTTAGCTTCGGG 3'

**VIL3A Reverse**

5'CCCGAAGCTAACCATGCTGCAGCATCTTTGTAGCC 3'

**AB-PCR Forward (*Nhe*I)**5'AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGAC 3'**AB-PCR Reverse (*Dra*III)**

5'GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACC 3'

**Tabelle 1: Übersicht über die Konstrukte und die dazugehörigen Primer**

Konstrukt/ Mutation	DNA-Matrize Vektor	N- und C-terminale Primer Mutationsprimer
pEmYFP / A206K	pEYFP pEYFP	AB-PCR Forward, AB-PCR Reverse A206K Forward, A206K Reverse

Gap43-YFP	Oligonukleotid pEmYFP	Gap43 Forward Gap43 Reverse
MyrPal-YFP	Oligonukleotid pEmYFP	MyrPal Forward MyrPal Reverse
HA-L-YFP	PA11sv13-HA pEmYFP	HA Forward HA-L Reverse
HA-K-YFP	PA11sv13-HA pEmYFP	HA Forward HA-K Reverse
HA-P-YFP	PA11sv13-HA pEmYFP	HA Forward HA-P Reverse
HA-C3S-L-YFP	PA11sv13-HA-M3 pEmYFP	HA Forward HA-C3S-L Reverse
HA-C3S-P-YFP	PA11sv13-HA-M3 pEmYFP	HA Forward HA-C3S-P-Reverse
HA-L-YFP / R339G	HA-L-YFP HA-L-YFP	HA Forward, AB-PCR Reverse R339G Forward, R339G Reverse
HA-L-YFP / VIL3A	HA-L-YFP HA-L-YFP	HA Forward, AB-PCR Reverse VIL3A Forward, VIL3A Reverse

Auf die Darstellung des jeweiligen pEmCerulean-Konstrukts wurde verzichtet, da dieses genau wie das pEmYFP-Konstrukt entstanden ist. Weiterhin wurden die Mutationen R339G und VIL3A zusammen mit C3S in vielen Varianten kloniert, hierbei wurde aber immer das Konstrukt ohne Mutation als DNA-Matrize und Vektor verwendet. Außerdem wurden dabei immer die hier aufgeführten Primer verwendet.

### 3.3 Kits

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Invisorb Fragment CleanUp	Reinigung von DNA-Fragmenten	Invitek, Berlin, Deutschland
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Reinigung von Plasmiden	Invitek, Berlin, Deutschland
PureYield Plasmid Maxiprep	Reinigung von Plasmiden	Promega, Mannheim,

System	Deutschland
--------	-------------

### 3.4 Geräte und Material

35-mm-Glasbodenschälchen (**MakTek Corp., Ashland, MA, USA**)

Brutschrank (**Heraeus, Berlin, Deutschland**)

CL-XPosure-Film (**Perbio Science, Bonn, Deutschland**)

Geltrockner (**UniEquip Laborgerätebau + Vertrieb, Martinsried, Deutschland**)

Kodak „X-Omat AR“-Film (**Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland**)

Konfokalmikroskop Fluo View-1000 (**Olympus, Hamburg, Deutschland**)

Nano-Drop 1000 Spectrophotometer (**Peqlab, Erlangen, Deutschland**)

PVDF-Membran (**Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland**)

Semi-Dry-Blot-Apparatur, T3-Thermocycler (**Biometra, Göttingen, Deutschland**)

Thermocycler „mastercycler gradient“ (**Eppendorf, Hamburg, Deutschland**)

Avanti J25 High-performance Zentrifuge (Rotoren: JA-25.50 und JLA-16.250), Ultrazentrifuge L7 65 (Rotoren: SW28, SW40) (**Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland**)

### 3.5 Puffer und Medien

#### 3.5.1 Zellkulturmedien

**Kulturmedium:** DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin

**Einfriermedium:** 30% FCS, 10% DMSO, 60% DMEM

**Markierungsmedium:** MEM mit EBSS, 4 mM Glutamin

**Selektionsmedium:** DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin, 500 µg/ml G418

### 3.5.2 Puffer

**Fusionspuffer:** 10 mM MES, 10 mM Hepes in PBS<sup>+Ca+Mg</sup>, pH 5,0

**MNT-Puffer** (Trimerisierungsexperiment): 20 mM MES, 30 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 in H<sub>2</sub>O, pH 7,5

**RIPA-Puffer:** 1% Triton X-100, 1% Desoxycholat, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 20 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM Jodacetamid, 1 mM PMSF in ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4

**TNE-P-Puffer:** 25 mM Tris-HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF in ddH<sub>2</sub>O

**Sammelgel (5%):** 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 3,75 ml 4× Tris-HCl pH 6,8, 8,75 ml ddH<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED, 40 µl APS (10%)

**Trenngel (10%):** 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 3,75 ml 4× Tris-HCl pH 8,8, 6,25 ml ddH<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED, 80 µl APS (10%)

**Trenngel (15%):** 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 3,75 ml 4× Tris/HCl pH8,8, 8,75 ml ddH<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED, 80 µl APS (10%)

**10× PAGE-Puffer:** 30 g Tris-Base, 110 g Glycin, 10 g SDS in 1 l ddH<sub>2</sub>O

**6× SDS-PAGE-Probenpuffer:** 15% DTT, 15% SDS, 1,5% Bromphenolblau, 50% Glycerin in ddH<sub>2</sub>O

**Fixierer (für Polyacrylamidgele):** 10% Ethanol, 10% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O

**10× Transferpuffer:** 15,1 g Tris, 72 g Glycin, 2,5 g SDS in 500 ml ddH<sub>2</sub>O

**Transferpuffer** (Western Blot): 5 ml 10× Transferpuffer, 10 ml Methanol, 35 ml ddH<sub>2</sub>O

**20× PBS:** 160 g NaCl, 4 g KCl, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, pH 7,2–7,4 in 1 l ddH<sub>2</sub>O

**Milchlösung** (Western Blot): 50 g Magermilchpulver, 50 ml 20× PBS, 1 ml Tween in 1 l ddH<sub>2</sub>O

**50× TAE-Puffer** (für Agarosegele): 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 in ddH<sub>2</sub>O

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologie

#### 4.1.1 Polymerasenkettenreaktion

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) dient zur enzymatischen Vermehrung von definierten Gensequenzen *in vitro*.

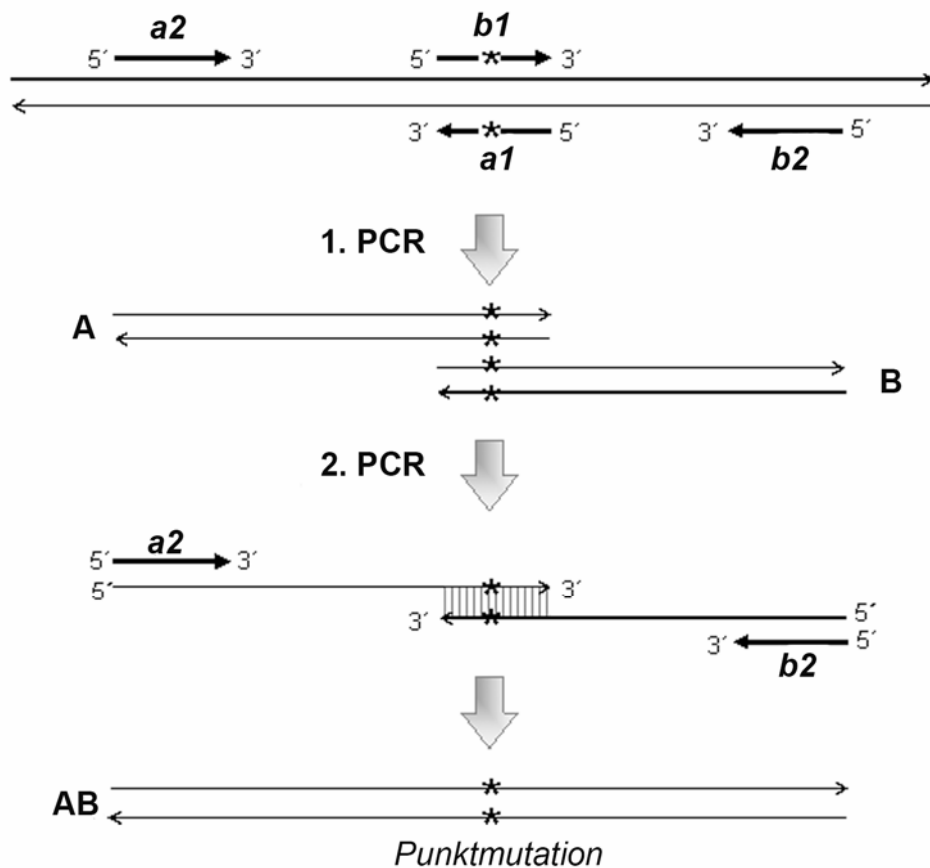
##### 4.1.1.1 Standard-PCR

Der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR (Saiki et al., 1985) zur einfachen Amplifizierung der DNA setzte sich zusammen aus 50 ng dsDNA, 0,5 mM dNTPs, 1  $\mu$ M jedes Primers, 5 U Polymerase und 10  $\mu$ l 10 $\times$  Reaktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l. Im Thermocycler-Profil folgten nach der Initialdenaturierung von 3 min bei 95 °C 24 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung für 30 sec bei 94 °C, einer 1-minütigen Primer-Anlagerung (Annealing) bei 52 °C und einer Kettenverlängerung (Elongation) bei 68 °C für 1 Minute je 1 kb Länge des zu amplifizierenden Fragments. Final wurde noch eine 10-minütige Verlängerung bei 68 °C durchgeführt.

##### 4.1.1.2 AB-PCR

Zur Einführung der Mutationen A206K, R339G und VIL3A wurde das Prinzip der „überlappenden Verlängerungs-PCR“ (Urban et al., 1997; Veit et al., 2002), hier als AB-PCR bezeichnet, verwendet (Abb. 13). Dabei werden vier Primer benötigt, zwei äußere, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle enthalten (a2, b2) und zwei innere Primer, die zueinander komplementär sind und in der Mitte die einzuführende Mutation enthalten (a1, b1). In einer ersten PCR wird die DNA-Matrize dann in zwei Ansätzen einmal mit den A-Primern und einmal mit den B-Primern verlängert. Es bilden sich so zwei Amplifikate (A und B), die dann in der zweiten PCR gegenseitig als Primer dienen können. Zusammen mit den beiden Außenprimern wird so in der zweiten PCR ein DNA-Fragment hergestellt, das aus den beiden fusionierten Fragmenten der ersten PCR besteht (AB), an jeder Seite eine Restriktionsschnittstelle und in der Mitte die gewünschte Mutation trägt. Dieses AB-Fragment kann nun an anstatt des Frag-

ments ohne Mutation in den ursprünglichen Vektor einkloniert werden. Das PCR-Protokoll entsprach hier dem der Standard-PCR, und der Reaktionsansatz wurde auf dieselbe Weise hergestellt, wobei in der ersten PCR ein DNA-Template eingesetzt wurde und in der zweiten PCR dann ein Bruchteil der aus einem Agarosegel aufgereinigten A- und B-Fragmente.



**Abbildung 13: Übersicht über die AB-PCR.** Die beiden Außenprimer *a2* und *b2* enthalten die Restriktionsschnittstellen, die Innenprimer (*a1*, *b1*) sind zueinander komplementär und enthalten mittig die einzuführende Mutation. Nach (Veit et al., 2002).

#### 4.1.2 Restriktionsverdau und Reinigung von Plasmiden und PCR-Produkten

Zur enzymatischen Spaltung der DNA wurden zwei enzymatische Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonukleasen verwendet. Durch den Verdau entstehen sowohl in der Vektor-DNA als auch am Fragment überlappende, einzelsträngige Bereiche, sog. kohäsive Enden, die dann miteinander ligiert werden können. PCR-Fragmente wurden vor dem Verdau im Agarosegel aufgetrennt und anschließend (mittels „Fragment CleanUp“-Kit) aufgereinigt. Das Re-

aktionsvolumen eines Verdaus betrug 10 bis 30  $\mu\text{l}$  und wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um eine Re-Ligation der Vektoren zu verhindern, wurde 30 min vor Ende des Verdaus jeweils eine enzymatische Einheit CIP zu dem jeweiligen Vektor gegeben. Dann erfolgte die Auftrennung der verdauten Fragmente im Agarosegel.

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden die DNA-Fragmente auf der Basis ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung wurde mit 1%igen Agarosegelen in TAE-Puffer, mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid, bei 100 mA durchgeführt. Mit Hilfe einer UV-Lampe (302 nm Anregungswellenlänge) konnte die Größe der DNA-Fragmente durch Vergleich mit dem Standard-Marker bestimmt werden. Zur Extraktion der gewünschten Plasmidfragmente und PCR-Produkte aus dem Gel wurde das Extraktionskit „Invisorb Fragment CleanUp“ nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.3 Ligation und Transformation der DNA-Fragmente

Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase oder der Quick Ligase nach Herstellerangaben. Hierbei werden die 5'-Phosphatgruppen mit den 3'-Hydroxylgruppen der kohäsiven Enden von Fragment und Vektor über die Bildung von Phosphodiesterbindungen verknüpft. Es wurde je 1 Einheit Ligase in einem Reaktionsvolumen von 30  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Das Verhältnis Fragment zu Vektor betrug 5:1. Die Ligation erfolgte für 1–2 h (T4 Ligase) bzw. 15 min (Quick Ligase) bei RT. Anschließend wurden XL-1-blue-Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert.

Für die Herstellung chemisch kompetenter XL-1-blue-Zellen wurden 500  $\mu\text{l}$  einer 3-ml-YT-Übernachtskultur 1:100 mit YT-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{660}$ ) von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis heruntergekühlt und bei 3000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder für 15 min bei 3000 rpm, 4 °C, abzentrifugiert und in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Zur Kryoprotektion wurde die Zellsuspension 4:1 mit Glycerin versetzt. 650- $\mu\text{l}$ -Aliquots wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach dem Hinzufügen des Ligationsansatzes wurde die Reaktion für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von ei-



nem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Nach Zugabe von 600 µl YT-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 45 min geschüttelt und dann auf YT-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert.

#### 4.1.4 Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen

Mit Hilfe des „Invisorb Plasmid Mini Two“-Kits wurde eine Plasmid-Mini-Präparation nach Herstellerangaben aus einer 3-ml-Übernachtskultur in YT-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 80 µl ddH<sub>2</sub>O.

Für eine Plasmid-Maxi-Präparation wurde das „PureYield Maxi Prep“-System nach Herstellerangaben verwendet. Das Volumen der Übernachtskultur betrug 200 bis 400 ml YT-Medium mit einer Kanamycin-Konzentration von 50 µg/ml. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 1 ml ddH<sub>2</sub>O.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit einem Nano-Drop-Spektrophotometer bestimmt.

Die Kontrollsequenzierung der Konstrukte wurde von der Firma Invitek durchgeführt. Folgende Sequenzierprimer wurden verwendet:

**CMV for:**

5'CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'

**HA-uncl for:**

5'ATATCATCAATCTTTTGTGCCGAG 3'

**HA-end for:**

5'TGACGATGATTGTATGGCTAGTAT 3'

## 4.2 Zellkultur

### 4.2.1 Kultivierung von Zellen

Die CHO- und MDCK-II-Zellen wurden in Kulturmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 5 min bei

37 °C mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Kulturmedium zur Zellsuspension gegeben und dann 1/10 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 12 ml Kulturmedium überführt. Bis auf die Experimente bezüglich des apikalen Transports der Proteine in Transwells fanden alle Versuche an CHO-Zellen statt.

Um die Zellen einfrieren zu können, wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums aus einer konfluenten Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM verdünnt, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, RT, 1000 rpm), danach wurde der Überstand abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen in 2–3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert, auf 3 Kryoröhrchen verteilt, bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in den Stickstofftank überführt.

Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und die pelletierten Zellen in frischem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden sie in eine Zellkulturflasche überführt.

#### 4.2.2 Transfektion

Für die Transfektion der CHO- und MDCK-II-Zellen wurde Lipofectamine 2000 nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde die angegebene Menge Lipofectamine 2000 in DMEM verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert, ebenso die erforderliche Menge an DNA. Für die 35-mm-Petri- oder Glasbodenschälchen handelte es sich um 10 µl Lipofectamine 2000 und 4 µg DNA. Anschließend wurden beide Gemische zusammengeführt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen waren 24 h zuvor in die Transfektionsschalen ausgesät worden. Nach einmaligem Waschen mit DMEM wurden die Zellen für 4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem DNA-Lipofectamin-Gemisch inkubiert. Anschließend wurden das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 20 h inkubiert. Der eigentliche Versuch fand 24 h nach der Transfektion statt.

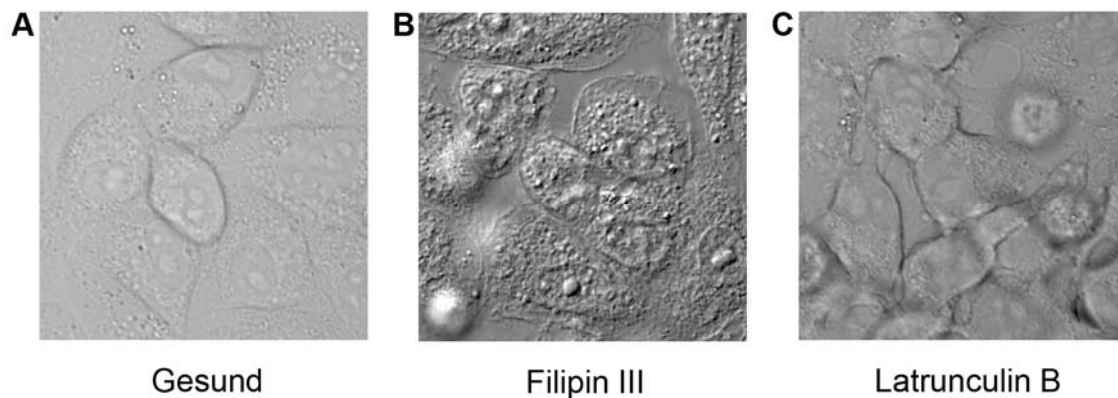
### 4.2.3 Inhibitoren

Zur Untersuchung der intrazellulären Mechanismen wurden verschiedene Inhibitoren des Zytoskeletts und der Membran-Rafts verwendet.

	<i>Konzentration (Lösungsmittel)</i>	<i>Inkubationsbedingungen</i>
<b>Zytoskelett-Inhibitoren</b>		
Cytochalasin D	1 $\mu$ M (DMSO)	20 h, 37 °C
Latrunculin B	0,5 $\mu$ M (DMSO)	15 min, 37 °C
<b>Cholesterin-Inhibitoren</b>		
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD)	5–10 mM (PBS)	30 min, 37 °C
Filipin III	5 $\mu$ g/ml (DMSO)	30 min, 37 °C

Cytochalasin D ist ein zellpermeables Pilztoxin, das Aktin-Mikrofilamente zerstört und die Aktinpolymerisierung inhibiert. Latrunculin B ist ein strukturell einzigartiges Meerestoxin. Es inhibiert ebenfalls die Polymerisierung von Aktin und zerstört darüber hinaus Aktin-Mikrofilamente und stört Mikrofilament-vermittelte Prozesse. Dabei wirkt es 10- bis 100fach stärker als Cytochalasine. Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin ist ein aus sieben Glukosemolekülen bestehendes kreisförmiges Oligosaccharid. Durch die hydrophobe Kavität im Innern und die polare Außenfläche ist es in der Lage, mit anorganischen Verbindungen wie Cholesterin sogenannte Einschlussverbindungen zu bilden. Dadurch wird das Cholesterin der Zellmembran entzogen (Zidovetzki und Levitan, 2007). Filipin III ist die Hauptkomponente der acht isomeren Komponenten von Filipin. Es bindet an Cholesterin, welches in die Membran eingelagert ist, und bildet Aggregate und Komplexe aus, die mit Hilfe von Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können.

Bei diesen Inhibitionsversuchen stellte sich heraus, dass Latrunculin B und Filipin III sehr toxisch auf die Zellen wirken (Abb. 14); deshalb wurden alle weiteren Experimente mit Cytochalasin D und M $\beta$ CD durchgeführt, welche keine toxischen Effekte aufzeigten.



**Abbildung 14: Schädigung der Zellen durch Filipin III und Latrunculin B.** A–C: Die Differential-Interferenz-Kontrast-Bilder zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen (A), dass die Behandlung mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Filipin III (B) oder 0,5  $\mu\text{M}$  Latrunculin B (C) die Zellen stark schädigt.

#### 4.2.4 Extrazelluläre Spaltung von HA mit Trypsin

Für den Vergleich zwischen gespaltenem und ungespaltenem HA wurde das ungespaltene HA nachträglich extrazellulär mit Trypsin gespalten. Für diese Spaltungsexperimente wurden jeweils 4 Ansätze parallel mit uncl.-HA wt transfiziert und kurz vor dem Versuch wie folgt behandelt:

1. unbehandelt
2. 5  $\mu\text{g/ml}$  Trypsin, 5 min, RT
3. 2 ml Fusionspuffer pH 5,0, 3 min, 37 °C
4. 5  $\mu\text{g/ml}$  Trypsin, 5 min, RT und anschließend 2 ml Fusionspuffer pH 5,0, 3 min, 37 °C

Alle Ansätze wurden vor und zwischen den Inkubationszeiten jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Inkubation wurde je nach Untersuchungsmethode wie folgt verfahren: Für den Western Blot wurden die Zellen mit SDS-Probenpuffer lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die FLIM-FRET-Experimente wurden die Zellen nochmals mit phenolfreiem DMEM gewaschen, anschließend wurde die Messung am Mikroskop durchgeführt.

### 4.3 Biochemie

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde bei allen folgenden biochemischen Versuchen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierbei wird die Porengröße des Polyacrylamid-Netzwerkes der Größe der zu trennenden Proteine angepasst, indem die Konzentration an Acrylamid variiert wird. SDS hat hierbei eine denaturierende Funktion und bindet darüber hinaus die Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4:1. Dies maskiert die Eigenladung der Proteine; dadurch ist die Migrationsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld ungefähr proportional zum Logarithmus seiner Masse. Vor der Auftragung der Proben auf das Gel wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 180 V durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine entweder auf eine Membran geblottet, oder das Gel wurde im Falle radioaktiver Markierung für die Visualisierung der Proben mit einem Röntgenfilm weiterverarbeitet. Hierfür wurde das Gel über Nacht in Fixierer inkubiert und anschließend zweimal für jeweils 15 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach einer Inkubation in 1 M Salicylat für 30 min wurde das Gel getrocknet, daraufhin wurde ein empfindlicher Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition des Films erfolgte bei –80 °C für wenige Tage bis einige Wochen in einer lichtdichten Kassette.

#### 4.3.1 Western Blot

Für den Nachweis mit Antikörpern wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel mittels eines elektrischen Feldes auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran überführt. Der Transfer erfolgte bei 110 mA pro Gel (6 × 8 cm) in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur für 70 min. Anschließend wurde die Membran in Milchlösung für 1 h blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte jeweils über Nacht bei RT mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:2.000. Nach dreimaligem Waschen für 10 min wurde die Membran daraufhin mit dem 2. Antikörper, bei einer Verdünnung von 1:10.000, für 1 h bei RT inkubiert. Für die Visualisierung der Proteine wurde das „ECL plus Western Blotting Detection System“ nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Membran mit einem „CL-XPosure-Film“ für verschieden lange Zeiten in einer lichtundurchlässigen Kassette inkubiert, der Film anschließend entwickelt und fixiert und nach dem Trocknen eingescannt.

### 4.3.2 Lipid-Raft-Aufreinigung

Die Lipid-Raft-Aufreinigung dient der Trennung von Detergens-resistenten Membranen (DRMs) von den restlichen Membranen der Zelle. Dies geschieht dadurch, dass die Zellen mit Triton lysiert werden und anschließend die Triton-unlöslichen DRMs in einem Sucrosegradienten mittels Zentrifugation aufgetrennt werden. Hierbei flotieren die DRMs nach oben, während die Detergens-löslichen Membranen in den Sucrose-dichten Regionen, am Boden des Zentrifugenröhrchens, verbleiben. Da die DRMs in ihrer Lipidzusammensetzung den Membran-Rafts ähnlich sein sollen, kann somit nachgewiesen werden, ob sich ein Protein in Rafts befindet. Für die Lipid-Raft-Aufreinigung wurden CHO-Zellen in 10-cm-Schalen transfiziert und 24 h später mit TNE-P-Puffer für 20 min auf Eis lysiert. Die Zellsuspension wurde dann 1:1,25 mit 80% TNE-P/Sucrose vermischt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde mit 6 ml 35% TNE-P/Sucrose und 3 ml 5% TNE-P/Sucrose überschichtet und bei 4 °C und 23.000 rpm für 16–18 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Rotor: SW28). Der Sucrosegradient wurde dann in 1-ml-Schritten aliquotiert. Jeweils die Hälfte jeder Probe wurde anschließend mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt: Hierbei wurden 500 µl Probe 1:1 mit 20% TCA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine bei 14.000 rpm, 4 °C, für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und jeweils für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 1,5× Probenpuffer aufgenommen, anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot konnten die jeweils untersuchten Proteine in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden.

### 4.3.3 Radioaktive Markierung von Proteinen

Die Charakterisierung der HA-Konstrukte erfolgte hauptsächlich über die metabolische Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und mit  $^3\text{H}$ -Palmitat zum Nachweis der Palmitoylierung. Für beide Ansätze wurden die Zellen in 35-mm-Petrischalen ausgesät und 24 h vor der Markierung mit dem entsprechenden HA-Konstrukt transfiziert.

#### 4.3.3.1 $^{35}\text{S}$ -Markierung

Für die metabolische Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Markierungsmedium, welches kein Methionin enthält, für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden zu jeder Probe 3  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin gegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37 °C, deren Dauer vom jeweiligen Versuch abhängig war. Bei Pulse-Chase-Experimenten wurden die Zellen für 3 oder 30 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin inkubiert, danach mit DMEM anstelle des Markierungsmediums versetzt und für verschieden lange Chase-Zeiten weiter bei 37 °C inkubiert. Bei allen Experimenten ohne Pulse-Chase wurden die Zellen für 4 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen immunpräzipitiert. Hierfür wurden 500  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer zugegeben und die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde dann für 20 min bei 20.000 $\times g$  abzentrifugiert und der Überstand über Nacht mit einer geeigneten Menge Antikörper (anti-KP oder anti-GFP) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 40  $\mu\text{l}$  Protein-A-Sepharose versetzt und für weitere 2,5 h inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Protein-A-Komplexe wurden danach abzentrifugiert (3 min, 3.000 rpm) und viermal mit RIPA-Puffer gewaschen. Die Solubilisierung der pelletierten Komplexe erfolgte durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C in SDS-haltigem Probenpuffer.

#### 4.3.3.1.1 Untersuchung der intrazellulären HA-Spaltung

Im Laufe der Prozessierung von HA wird dieses im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in die durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten. Diese Spaltung kann nachgewiesen werden, indem man die  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markierten Proben in zwei Ansätze aufteilt und je einen mit reduzierendem und nicht-reduzierendem Probenpuffer auf ein Polyacrylamidgel aufträgt und mittels eines Röntgenfilms sichtbar macht.

#### 4.3.3.1.2 Glykosidase-Verdau

Um die Glykosylierung der HA-Konstrukte zu untersuchen, wurden die Proben nach der  $^{35}\text{S}$ -Markierung nicht in Probenpuffer aufgenommen, sondern ein Glykosidase-Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Endoglykosidase H (Endo-H) spaltet hierbei Mannose-reiche Seitenketten ab, was bei einem Großteil der HA-Glykosylierungen nur dann möglich ist, wenn das Protein den Golgi-Apparat noch nicht verlassen hat, da fünf der sieben Zuckermodifikationen ansonsten zu Endo-H-resistenten Glykosylierungen weiterprozessiert werden. Die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase-F) verdaut dagegen alle N-glykosidisch gebundenen Seitenketten und kann somit alle HA-Glykosylierungen abspalten, unabhängig davon, in welchem Stadium der Prozessierung sich das HA-Konstrukt befindet (Keil et al., 1985). Zur Glykosylierungsanalyse wurde jeder Ansatz nach der Immunpräzipitation in drei Ansätze aufge-

teilt, wobei einer als Kontrolle diente, einer mit Endo-H und einer mit PNGase-F verdaut wurde. Der Verdau erfolgte nach Herstellerangaben für 1 h bei 37 °C mit jeweils 1000 Einheiten der entsprechenden Glykosidase. Anschließend wurden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer versehen, auf ein 10%-Polyacrylamidgel aufgetragen, darin aufgetrennt und mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### 4.3.3.1.3 Trimerisierungs-Experiment

Für den Nachweis der HA-Trimerisierung wurde radioaktiv-markiertes HA mit Trypsin verdaut. Alle HA-Proteine die zum Zeitpunkt des Verdaus schon als Trimer vorliegen werden dabei in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer gespalten. Alle HA-Monomere werden komplett verdaut. Hierbei wurden die Zellen wie oben beschrieben für 3 min mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und anschließend für 0, 7,5, 15 und 30 min ohne <sup>35</sup>S-Methionin weiterinkubiert (Chase). Die Lyse bei 4 °C für 15 min erfolgte hier jedoch mit MNT-Puffer, welcher die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine intakt lässt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20.000× g, 4 °C, 20 min), danach wurde der Überstand auf zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt, wobei das eine mit 15 µl PBS (Kontrolle), das andere mit dem in PBS-gelösten Trypsin (Endkonzentration: 5 µg/ml) versetzt wurde. Die Proben wurden dann für 2 min bei RT inkubiert und anschließend mit 50 µg/ml Soybean Trypsin-Inhibitor für weitere 15 min bei 4 °C inkubiert, um die Reaktion abzustoppen. Anschließend wurde je 1 µl anti-KP-Antiserum zugegeben und die Proben über Nacht inkubiert. Die Zugabe der Protein-A-Sepharose und das Waschen der Proben erfolgte wie unter Punkt 4.3.3.1 beschrieben, ebenfalls mit RIPA-Puffer. Die in reduzierendem Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden dann in einem 10%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### 4.3.3.2 Palmitat-Markierung

Für den Nachweis der Palmitoylierung der HA-Konstrukte wurden von jedem zu untersuchenden Konstrukt zwei Ansätze hergestellt. Einer davon wurde mit <sup>35</sup>S-Methionin, wie oben beschrieben, markiert, der andere für die Markierung mit <sup>3</sup>H-Palmitat direkt 24 h nach der Transfektion mit 250 µCi/ml Medium <sup>3</sup>H-Palmitat versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Immunpräzipitation wurde wie unter 3.3.3.1 beschrieben durchgeführt.

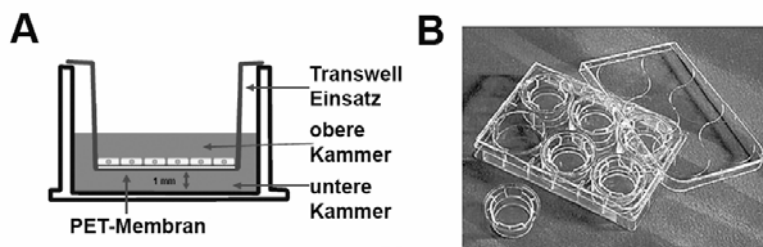


## 4.4 Konfokalmikroskopie

Die Bild-Aufnahmen und Messungen am Konfokalmikroskop wurden mit einem Olympus FluoView 1000 bei 25 °C durchgeführt. Es wurde ein Öl-Immersions-Objektiv mit einer 60× Vergrößerung und einer numerischen Apertur (NA) von 1,35 verwendet. Konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden durch sequentielle Anregung von Cerulean und YFP gewonnen. Cerulean wurde dabei mit einer Laserdiode bei 440 nm angeregt und die Emission zwischen 460 und 490 nm detektiert. YFP wurde durch einen Argonlaser bei 515 nm angeregt, und die Detektion der Emission erfolgte zwischen 535 und 575 nm. Zusätzlich wurde noch ein Differential-Interferenz-Kontrastbild (DIC) aufgenommen. Alle Fluoreszenzbilder sind in Falschfarben und in dieser Arbeit einheitlich in Grün dargestellt.

### 4.4.1 Polares Wachstum der Zellen

Um den Transport von Proteinen in polar wachsenden Zellen untersuchen zu können, müssen diese auf sogenannte Transwells ausgesät werden (Abb. 15). Diese enthalten eine PET (Polyester)-Membran, die es den Zellen ermöglicht, polar zu wachsen. Die Zellen wurden hierfür 24 h vor der Transfektion auf die PET-Membran ausgesät und dann wie oben beschrieben transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion erfolgte der Wechsel zu Selektionsmedium. Dieses wurde dann jeden Tag gewechselt. Die Untersuchungen am Konfokalmikroskop fanden 10–18 Tage nach dem Aussäen statt. Hierzu wurde die Membran mit einem Skalpell aus der Halterung herausgeschnitten und invers auf einen Objektträger gelegt. Einzelne Zellen wurden dann mit einem z-Stack vermessen, wobei dabei die ganze Zelle in 1- $\mu$ m-Schnitten in z-Richtung aufgenommen wurde. Mit Hilfe des FluoView1000-3D-Programmes wurde anschließend ein dreidimensionales Bild der Zellen generiert.



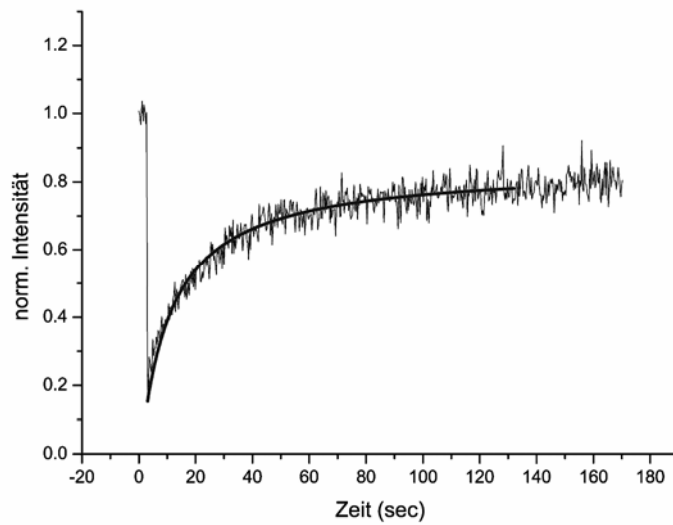
**Abbildung 15: Transwell. A:** Schematische Darstellung eines Transwells. Die Zellen werden in die obere Kammer ausgesät und haben durch die Poren in der PET-Membran auch die Möglichkeit, Nährstoffe von unten aufzunehmen. Durch diese Eigenschaften wird es den Zellen ermöglicht, polar auf der PET-Membran zu wachsen. **B:** Foto einer 6-well-Platte mit Membraneinsätzen (aus Produktinformation Corning).

#### 4.4.2 FRAP

FRAP (engl. für Fluorescence Recovery After Photobleaching) dient der Messung des Diffusionskoeffizienten eines Proteins und der Ermittlung der mobilen Fraktion. Der Diffusionskoeffizient ist ein Maß dafür, wie schnell sich ein Protein bewegt, und die mobile Fraktion gibt an, wie viel Prozent der Moleküle beweglich sind. Für die Messung der mobilen Fraktion der hier verwendeten Membranproteine, HA und MyrPal, wurde die Plasmamembran am höchsten Punkt der Zelle, direkt über dem Nukleus, fokussiert. Ein Kreis mit einer Fläche von  $15,1 \mu\text{m}^2$  wurde ausgewählt, und die Bleicheinstellungen wurden so gewählt, dass ungefähr 70% der YFP-Proteine in dieser Region gebleicht wurden. Vor dem Bleichen wurden zehn Bilder mit geringer Intensität aufgenommen, und nach dem Bleichen wurde dieser Bereich für weitere 3 min gescannt. In dieser Zeit wird der Bereich durch Diffusion langsam wieder mit fluoreszierenden Proteinen aufgefüllt. Die Auswertung wurde in Origin 7.5 (OriginLab Corp.) durchgeführt. Die Intensitätskurven wurden mit einer Annäherung an folgende theoretische Rückgewinnungskurve angepasst (Axelrod et al., 1976; Kwon et al., 1994):

$$F(t) = (F_0 + F_r t) / (t + \tau)$$

Hierbei ist  $t$  die Zeit nach dem Bleichen,  $F(t)$  die Fluoreszenz als eine Funktion von  $t$ ,  $F_0$  ist die Fluoreszenzintensität direkt nach dem Bleichen,  $F_r$  der Anteil an Fluoreszenzrückgewinnung und  $\tau$  ist die halb-maximale Rückgewinnung. Die Intensitätskurven werden von dieser Anpassung sehr gut beschrieben (Abb. 16).



**Abbildung 16: Anpassung einer FRAP-Kurve von uncl.-HA-YFP wt.** Die graue Kurve gibt die Intensität der gebleichten Region während einer FRAP-Messung wieder. Die Anpassung (schwarze durchgezogene Linie) beginnt beim ersten Wert nach dem Bleichen und endet, wenn die Kurve ihr Plateau erreicht hat.

Folgende Formel wurde zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) verwendet:

$$D = (\gamma / 4) \frac{\omega^2}{\tau}$$

$\gamma$  beschreibt die Tiefe des Bleichens und hat unter diesen experimentellen Bedingungen den Wert 1,3 (Yguerabide et al., 1982),  $\omega^2$  ist der Radius (hier  $2,2\mu\text{m}$ ) und  $\tau$  die berechnete Zeit für die halb-maximale Rückgewinnung.

Die mobile Fraktion ( $M_f$ ) wurde anhand folgender Formel berechnet:

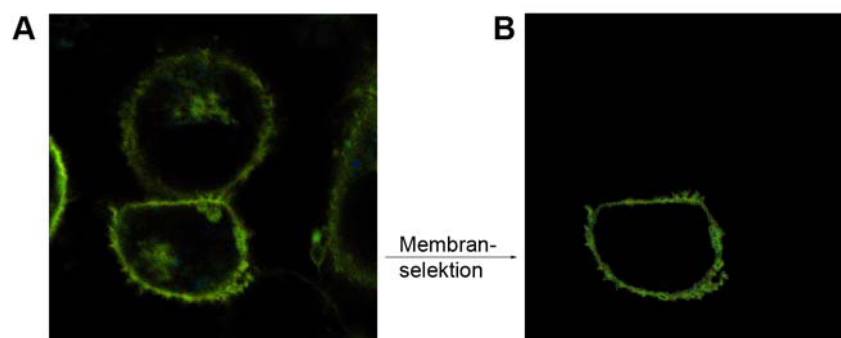
$$M_f = (F_r - F_0) / (1 - F_0)$$

### 4.4.3 FLIM-FRET

#### 4.4.3.1 FLIM

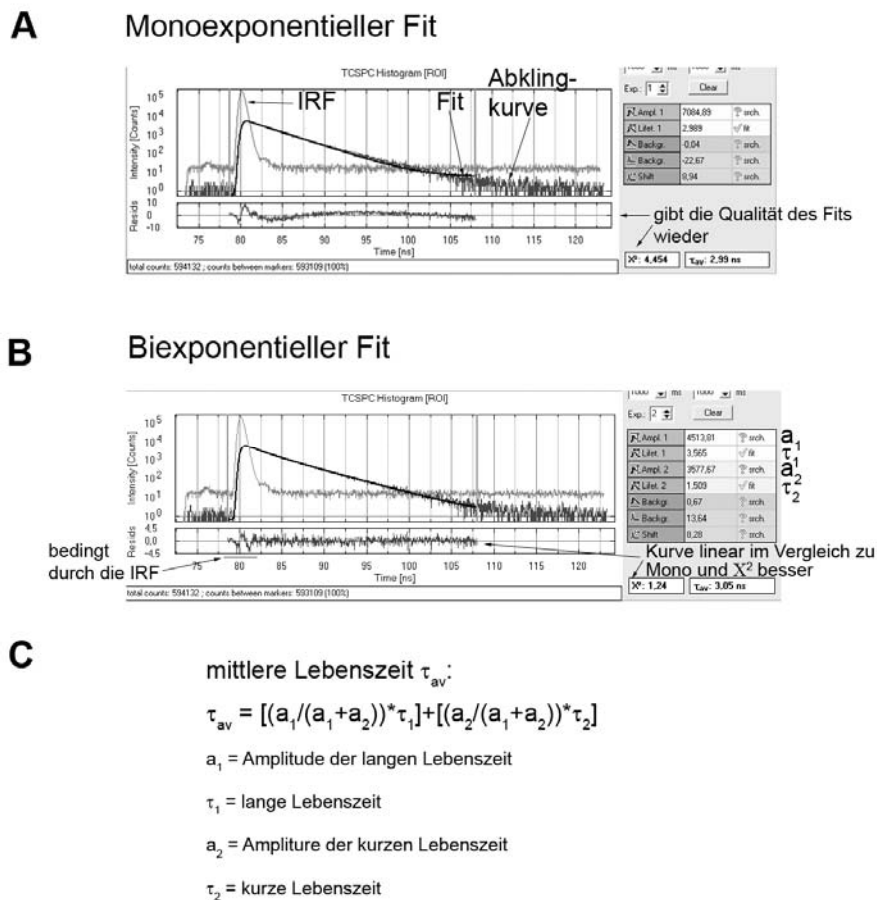
Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) kann verwendet werden, um die Lebenszeit eines Moleküls zu bestimmen. Bei der Lebenszeit handelt es sich um die mittlere Zeit, die ein Molekül in einem angeregten Zustand verbleibt, bevor es ein Photon emittiert und in den

Grundzustand zurückkehrt. Die FLIM-Aufnahmen wurden mit Hilfe des zeitauflösenden LSMupgrade-Kit (PicoQuant) generiert, das auf dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TPSCP = engl. für time correlated single photon counting) beruht. Hierbei kommt es zu einer wiederholten Zeitmessung zwischen der Anregung der Probe und der Detektion des ersten ausgesendeten Photons. Die Anregung erfolgt durch eine gepulste Laserdiode bei 440 nm. Detektiert wird die Fluoreszenz dann von einer Avalanche-Photodiode (SPAD = engl. für single photon avalanche diode) und einem  $470 \pm 15$  nm-Filter, im Falle von CFP bzw. Cerulean als Fluorophor. Verarbeitet werden die elekt-



**Abbildung 17: Selektion der Plasmamembran.** **A:** Lebenszeitintensitätsspektrum nach der Messung. **B:** Selektion der Membran, aus dieser wird dann die Fluoreszenzabklingkurve, wie zum Beispiel in Abb. 18 gezeigt, generiert.

rischen Signale von einer TimeHarp-200-PC-Karte. Diese Messungen wurden mit Hilfe der SymPhoTime-Software jeweils über 90 Sekunden akkumuliert, und man erhält ein Lebenszeitintensitätsspektrum für den gewählten Bildausschnitt. Für die Auswertung wurde anschließend die Plasmamembran selektiert (Abb. 17) und für diesen Bereich eine Fluoreszenzabklingkurve generiert, ein Histogramm der Verweilzeiten der Moleküle im angeregten Zustand (Abb. 18). Im Fall des hier verwendeten Donorfluorophors Cerulean wurde früher beschrieben, dass die Lebenszeit des Proteins sowohl durch eine monoexponentielle wie auch durch eine biexponentielle Anpassung beschrieben werden kann (Millington et al., 2007; Rizzo et al., 2004). In diesem Fall wurde das beste Ergebnis mit einer biexponentiellen Anpassung erzielt (Abb. 18). Unter Einbeziehung der zeitlichen Systemantwortfunktion (IRF = engl. für instrument response function) konnten dadurch zwei Abklingzeiten berechnet werden, aus denen dann die mittlere Lebenszeit der Fluorophore an der Plasmamembran berechnet wurde (siehe Formel Abb. 18 C).



**Abbildung 18: Fluoreszenzabklingkurven. A und B:** Vergleich einer mono- (A) und biexponentiellen (B) Anpassung (Fit) für HA-Cerulean. Die biexponentielle Anpassung beschreibt die Abklingkurve genauer. Dies ist anhand der blauen Linie unter der Kurve und anhand von  $\chi^2$  erkennbar, wobei  $\chi^2$  möglichst 1 sein sollte. **C:** Berechnung der mittleren Lebenszeit für jede einzelne Zelle.

#### 4.4.3.2 FLIM-FRET-Auswertung

Die Lebenszeit eines Fluorophors ist eine sehr sensitive Größe, die nicht von der Konzentration der Fluorophore in der Zelle abhängt, jedoch von chemischen Umgebungsveränderungen und durch Resonanz-Energie-Transfer beeinflusst wird. Försters Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist ein strahlungsfreier Übergang von einem Donor-Fluorophor, wie zum Beispiel Cerulean, auf ein Akzeptor-Fluorophor, wie YFP, wenn der Abstand der beiden nicht mehr als 10 nm beträgt. Außerdem müssen sich das Donor-Emissionsspektrum und das Akzeptor-Absorptionsspektrum überschneiden. Die Lebenszeit des Donors wird dabei durch das Vorhandensein eines Akzeptors verringert. Diese Verkürzung lässt sich anschließend als FRET-Effizienz (E%) ausdrücken. Hierfür wird der Mittelwert ( $\tau_{Dav}$ ) aus den mittleren Lebenszeiten

von zehn Zellen berechnet, die nur das Donor-Fluorophor enthalten. E% ergibt sich dann für jede doppeltransfizierte Einzelzelle wie folgt:

$$E\% = 1 - (\tau_{DA} / \tau_{Dav})$$

wobei  $\tau_{DA}$  die mittlere Lebenszeit einer Einzelzelle wiedergibt, die sowohl Donor als auch Akzeptor enthält (Abb. 18).

#### 4.4.3.3 Akzeptor-Intensitätsberechnung

Da die hier untersuchten Proteine frei in der Plasmamembran beweglich sind, kann der Energietransfer zum Teil auch bei zufälligem Zusammentreffen stattfinden. Deshalb ist es notwendig, E% in Abhängigkeit von der Akzeptorintensität zu betrachten. Hierfür wurde vor jeder FLIM-Messung ein Bild des Akzeptors, wie eingangs beschrieben, aufgenommen, anhand dessen dann die mittlere Intensität des Akzeptors ( $I(A)$ ) an der Plasmamembran für jede doppeltransfizierte Einzelzelle berechnet werden konnte. Dies wurde mit Hilfe von ImageJ durchgeführt, einem Programm, das die Selektion der Plasmamembran ermöglicht. Anschließend wurden die Einstellungen des Mikroskops, die Laserintensität (LI), der Hintergrund (Bg) und die Verstärkung (V), mit dem gewonnenen Mittelwert (Mw) verrechnet, um Zellen sehr unterschiedlicher Helligkeit miteinander vergleichen zu können.

$$I(A) = [(Mw - Bg) / LI] / V$$

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Intensitätsbereiche/-werte der Abbildungen 34 und 41 nicht mit den restlichen Graphen verglichen werden können, da in der Zwischenzeit einige Einstellungsveränderungen am Mikroskop vorgenommen wurden.

#### 4.4.3.4 Erzeugung der FLIM-FRET-Graphen

Zum Schluss wurden die FRET-Effizienz und die dazugehörige Akzeptorintensität jeder doppeltransfizierten Einzelzelle in einem Graphen aufgetragen. Für jeden Versuchsansatz wurden 30–40 Zellen vermessen, um die Abhängigkeit der Auswertung von einzelnen Zellen zu minimieren. Die Daten wurden anschließend nach einem von Zacharias et al. entworfenen Modell angepasst. In diesem Modell, welches die Bindung eines Liganden zu seinem Rezeptor beschreibt, ist die FRET-Effizienz eine hyperbolische Funktion der Akzeptorintensität. Die dazugehörige Gleichung liefert die Dissoziationskonstante  $K_D$  als Parameter, um die Assozia-

tionseigenschaften von Donor und Akzeptor zu beschreiben.  $K_D$  ist die Fluoreszenzintensität des Akzeptors, bei der 50% der Moleküle eine Assoziation (=FRET-Signal) mit dem Donor eingehen (Zacharias et al., 2002):

$$E\% = E\%_{\max} * F / (F + K_D)$$

Hier gilt die Annahme, dass  $E\%$  eine hyperbolische Funktion der Akzeptorintensität ( $F$ ) ist,  $E\%_{\max}$  ist die anhand der Anpassung berechnete maximale FRET-Effizienz. Ist die FRET-Effizienz proportional zur Akzeptorintensität, deutet dies darauf hin, dass sich die beiden Proteine nur zufällig treffen. In diesem Fall liegt der  $K_D$ -Wert im Bereich von  $F$ . Ist die FRET-Effizienz allerdings unabhängig davon, wie viel Akzeptor in der Zelle vorkommt, dann spricht dies für ein Klustern der beiden Proteine in Domänen, deren Größe im Bereich des Förster-Radius liegt, die somit nicht größer als 10 nm sind. In der hier vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass beide Proteine in Rafts lokalisiert sind. Der  $K_D$ -Wert ist in diesem Fall viel kleiner als  $F$ .

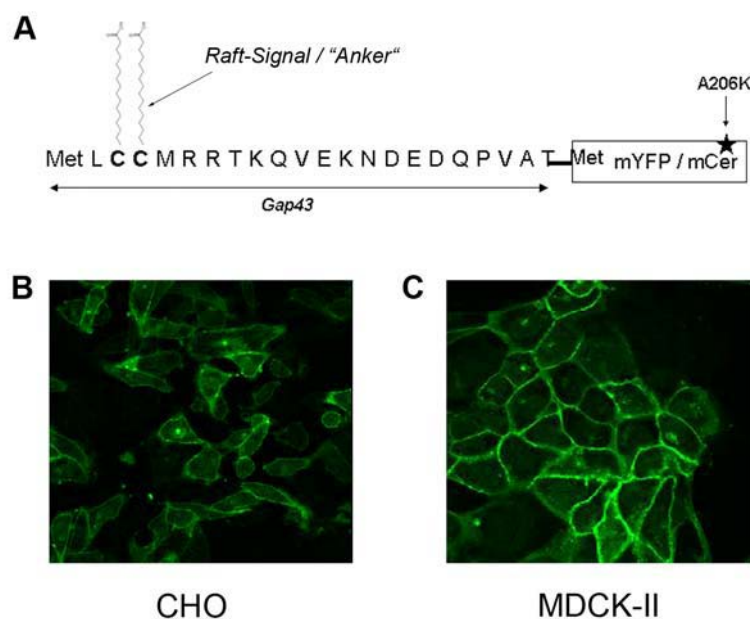
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Konstruktion der Raft-Marker

Ziel dieser Arbeit ist es, die Raft-Affinität von HA in lebenden Zellen zu untersuchen, und dies mit einer Methode, die wenn möglich keinen Einfluss auf die Rafts oder HA nimmt. FLIM-FRET gilt als geeignete Methode, um diesen Anforderungen gerecht zu werden. Um mittels FLIM-FRET nachweisen zu können, dass ein Protein in Membran-Rafts eingebaut wird, benötigt man insgesamt zwei Fluoreszenz-markierte Proteine: das zu untersuchende Protein, in diesem Fall HA-Cerulean, und ein Protein, von dem bekannt ist, dass es in Membran-Rafts vorkommt.

#### 5.1.1 Gap43-YFP

Gap43 ist ein Protein der Zellmembran und ein Substrat der Protein-Kinase C. Am N-Terminus ist dieses Protein zweifach palmytiert. Diese zweifache Palmytierung gilt als Raft-Signal (Milligan et al., 1995), und aus diesem Grund wurden die ersten 18 Aminosäuren von Gap43 an den N-Terminus von YFP fusioniert (Abb. 19 A). Die Transfektion der CHO- und MDCKII-Zellen mit dem Gap43-kodierenden Plasmid zeigte, dass das Protein in beiden Zelllinien an die Plasmamembran transportiert wird (Abb. 19 B, C).

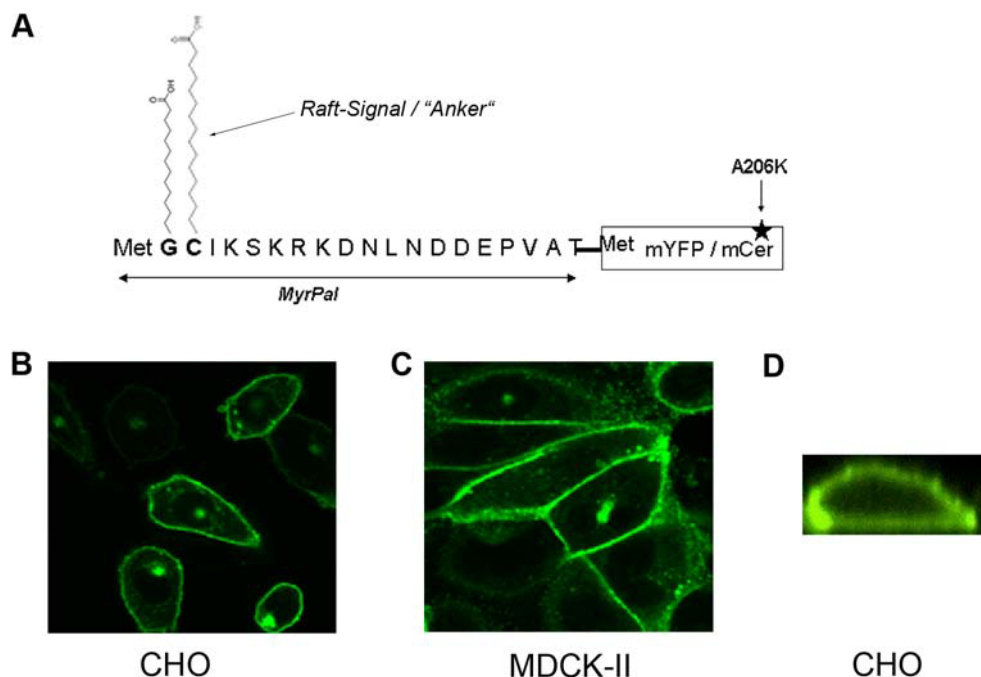




**Abbildung 19: Das zweifach-palmitylierte Konstrukt Gap43-YFP wird an die Plasmamembran transportiert.** **A:** Schematische Darstellung von Gap43-YFP inklusive der Palmitylierung. Die Mutation A206K verhindert die Dimerisierung des Fluorophors. **B und C:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer typischen Verteilung von Gap43-YFP in CHO- und MDCK-II-Zellen. Die Fluoreszenzdetektion im Innern der Zelle markiert wahrscheinlich den Golgi-Apparat.

### 5.1.2 MyrPal-YFP

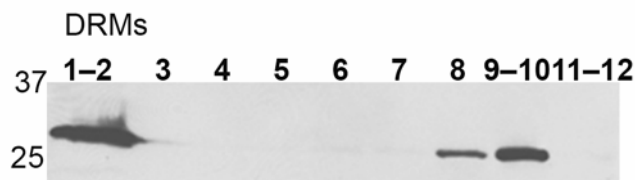
Der zweite Raft-Marker enthält 16 Aminosäuren der Lyn-Kinase, die ebenfalls mit YFP bzw. Cerulean fusioniert wurden. Dieser Marker besitzt im Gegensatz zu Gap43-YFP eine Myristylierungs- und eine Palmitylierungsstelle (Abb. 20 A). Konfokalmikroskopische Aufnahmen von CHO- und MDCK-II-Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, welches das Gen für MyrPal-YFP enthält, belegen den Einbau des Konstrukts in die Plasmamembran (Abb. 20 B). Insgesamt scheint MyrPal-YFP weniger diffus in der Zelle vorzukommen als Gap43-YFP. Dies könnte daran liegen, dass die Fettsäure bei einer Myristylierung im Gegen-



**Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigt die Lokalisation von MyrPal-YFP an der Plasmamembran.** **A:** Schematische Darstellung von MyrPal fusioniert mit einem Fluorophor, inklusive der Acylierungen. **B–D:** Typische Konfokalbilder von MyrPal-YFP exprimierenden CHO- und MDCK-II-Zellen. Die helle Fluoreszenz im Innern der Zelle spiegelt den Transport von MyrPal-YFP durch den Golgi wider. **D:** Es wurde ein z-Stack der Zelle angefertigt und mit Hilfe eines 3D-Programmes des Mikroskops ein Bildausschnitt in z-Richtung durch die Zelle erstellt.

satz zur Palmitoylierung irreversibel an das Protein gebunden ist (Berthiaume und Resh, 1995; da Silva und Klein, 1990). Aufgrund der besseren Membranaffinität wurde MyrPal für alle weiteren Versuche verwendet.

Die Etablierung von MyrPal-YFP als Marker für Rafts in der inneren Lipidschicht der Membran wurde in früheren Arbeiten anhand von FRET-Messungen mit Hilfe von Akzeptor-Photobleichen durchgeführt (Zacharias et al., 2002). Anhand der Triton-Extraktionsmethode konnte ebenfalls bestätigt werden, dass MyrPal-YFP hauptsächlich in den Detergens-resistenten Membranen vorkommt (Abb. 21). Dieses Extraktionsergebnis wurde freundlicherweise von Silvia Scolari (Molekulare Biophysik, HU Berlin) zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 21: MyrPal-YFP befindet sich größtenteils in Detergens-resistenten Membranen.** Mit MyrPal-YFP transfizierte CHO-Zellen wurden mit 1% Triton X-100 auf Eis lytiert und durch Zentrifugation mit einem Sucrosegradienten aufgereinigt. Hierbei flotieren die DRMs im Zentrifugenröhrchen nach oben in den Bereich mit einer geringen Sucrosekonzentration. Die Detergens-löslichen Bestandteile verbleiben am Boden des Röhrchens. Die einzelnen Sucrosefraktionen wurden dann auf ein SDS-Gel aufgetragen, MyrPal-YFP wurde mit Hilfe eines Western Blots mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. 1–12 definiert die Fraktionen des Sucrosegradienten, wobei 1, 2 bzw. 9, 10 und 11, 12 vereinigt wurden. Die Fraktion 1–2 entspricht den DRMs.

## 5.2 Konstruktion und Charakterisierung von Fluoreszenzmarkiertem HA

### 5.2.1 Der Linker zwischen HA und dem Fluorophor ist entscheidend für den Transport des Konstrukts an die Plasmamembran

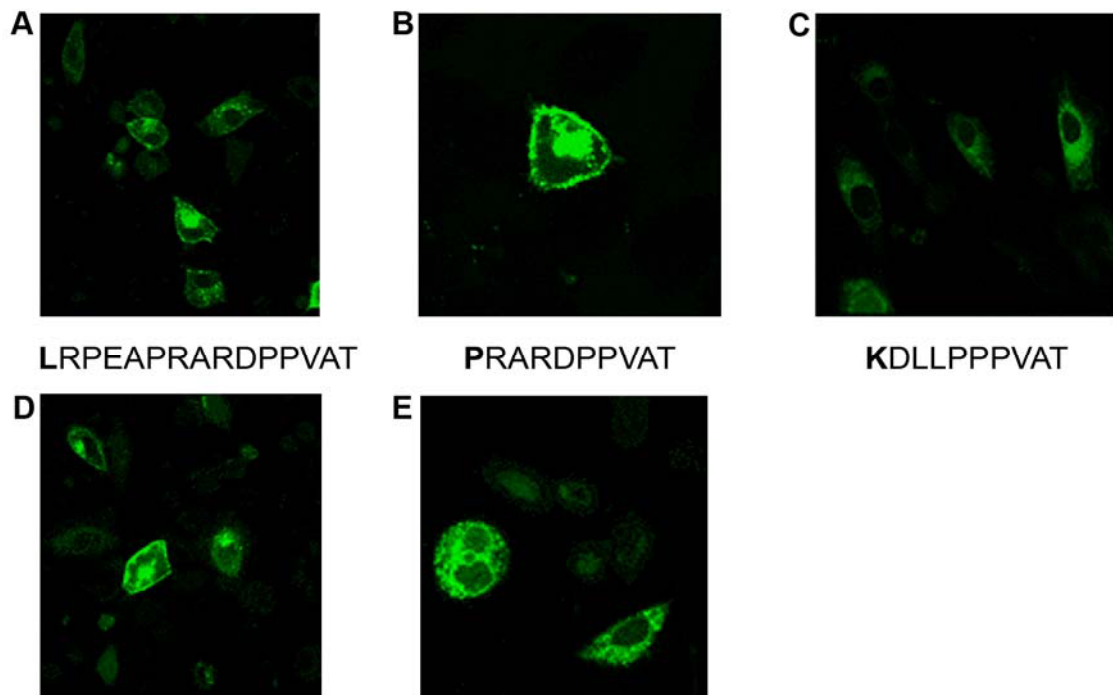
HA wurde C-terminal mit Cerulean verbunden. Um die Funktionalität und Beweglichkeit beider Proteine zu gewährleisten, wurden drei verschiedene Linkersequenzen entworfen, die den Abstand der beiden Proteine vergrößern. Die Linker bestehen aus 10–15 Aminosäuren und es wurde darauf geachtet, dass sie selbst keine Sekundärstrukturen ausbilden. Alle drei waren

Bestandteil eines Reverse-Primers für HA und wurden nach der ersten Aminosäure des Linkers benannt:

L = LRPEAPRARDPPVAT

P = PRARDPPVAT

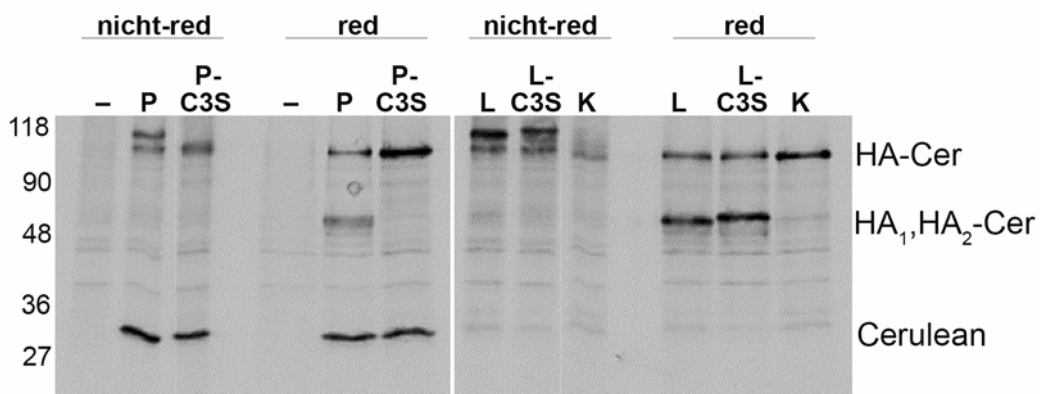
K = KDLLPPP VAT



**Abbildung 22: Konfokalbilder der HA-Konstrukte.** Alle Konstrukte wurden transient in CHO-Zellen exprimiert. **A:** HA-L-Cerulean, **B:** HA-P-Cerulean, **C:** HA-K-Cerulean, **D:** HA-L-C3S-Cerulean, **E:** HA-P-C3S-Cerulean.

Die Transfektion der drei Konstrukte (HA-L-Cerulean, HA-P-Cerulean, HA-K-Cerulean) in CHO-Zellen zeigte, dass die Konstrukte mit dem Linker L als auch mit dem Linker P an die Plasmamembran transportiert wurden (Abb 22 A, B). HA-K-Cerulean wurde zwar exprimiert, aber das Protein bleibt im ER oder Golgi stecken (Abb 22 C). Zusätzlich zum Wildtyp sollte aber auch die nicht-palmitoylierte Mutante C3S mit einem Fluorophor markiert werden. Bei dieser Mutante wurden die drei Cysteine in der Transmembranregion bzw. dem zytoplasmatischen Schwanz durch drei Serine ersetzt, und somit kann dieses Protein nicht mehr palmitoyliert werden (Veit et al., 1991). Da die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass HA-K-Cerulean nicht bis zur Plasmamembran transportiert wird, wurden für die Mutante nur die Linker P und L verwendet. Die CHO-Zellen wurden auch mit diesen Konstrukten (HA-L-

C3S-Cerulean, HA-P-C3S-Cerulean) transfiziert, und erstaunlicherweise wurde die C3S-Mutante nur mit dem Linker L an die Plasmamembran transportiert, mit dem Linker P jedoch nicht (Abb. 22 D, E). Der Transport des Fluoreszenz-markierten HAs wurde dann zusätzlich biochemisch untersucht. Dafür wurden fünf Ansätze von CHO-Zellen mit je einem der fünf Konstrukte transfiziert und für 4 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Anschließend wurden die Proben in zwei Ansätze aufgeteilt und unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 23). Dadurch kann festgestellt werden, ob HA in die beiden Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten wird, da die beiden Untereinheiten nach der Spaltung über Disulfidbrücken verbunden bleiben. Allerdings ist diese intrazelluläre Spaltung nur bei wenigen HA-Subtypen möglich, wie bei dem hier verwendeten Subtyp H7. Ein Großteil der HA Subtypen kann bei einer Expression in Zellkultur nur durch extrazelluläre Proteasen in die beiden Untereinheiten gespalten werden. Die in diesem Fall mögliche, intrazelluläre Spaltung findet im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt, also kurz vor dem Transport zur Plasmamembran. HA<sub>1</sub> hat eine Größe von 50 kDa und HA<sub>2</sub> von 26 kDa. Da HA<sub>2</sub> aber mit dem Fluorophor (Abb. 12) verbunden ist, erhöht sich die relative molare Masse auf das Niveau von HA<sub>1</sub>, und die beiden Untereinheiten sind nur als eine Doppelbande auf dem SDS-Gel detektierbar. Anhand von Abbildung 23 wird deutlich, dass HA-K-Cerulean und HA-P-C3S-Cerulean nicht wie die anderen drei Konstrukte gespalten werden, da keine Bande auf der Höhe von 50 kDa erkennbar ist. Bei den Konstrukten mit dem Linker P konnte zusätzlich eine Bande auf der Höhe von ca. 30 kDa detektiert werden, was der Größe des Fluorophors allein entspricht. Bei diesem Linker scheint Cerulean also zum Teil abgeschnitten zu werden.

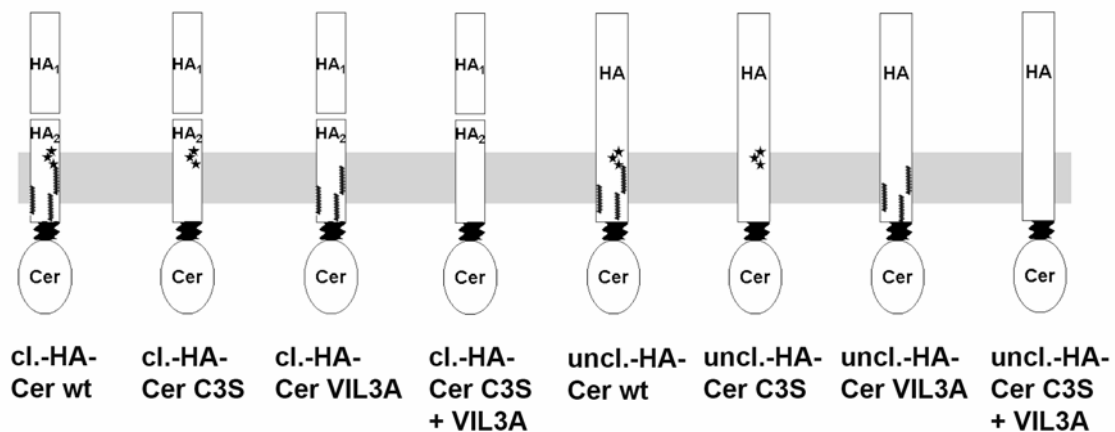


**Abbildung 23: Nur drei von fünf HA-Konstrukten erreichen das TGN.** CHO-Zellen wurden mit den HA-Konstrukten transfiziert und nach einer vierstündigen  $^{35}\text{S}$ -Markierung mit anti-GFP immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proben in zwei Fraktionen aufgeteilt und in einem SDS-Gel unter reduzierenden (red) bzw. nicht-reduzierenden (nicht-red) Bedingungen aufgetrennt. HA-Cer ist die ungespaltene Form, HA<sub>1</sub> bzw. HA<sub>2</sub>-Cer sind die gespaltenen Untereinheiten. P, K und L stehen für die HA-Konstrukte mit dem jeweiligen Linker, C3S für die Palmitoylierungsmutante, – markiert die nicht-transfizierte Kontrolle.

Aufgrund der hier gewonnenen Daten wurde für alle weiteren Versuche und HA-Mutanten der Linker L verwendet. Um die Konstruktnamen im Folgenden kurz zu halten, wurde jedoch darauf verzichtet, den Linker im Namen aufzuführen.

### 5.2.2 Alle HA-L-Cerulean-Konstrukte werden korrekt prozessiert und an die Plasmamembran transportiert

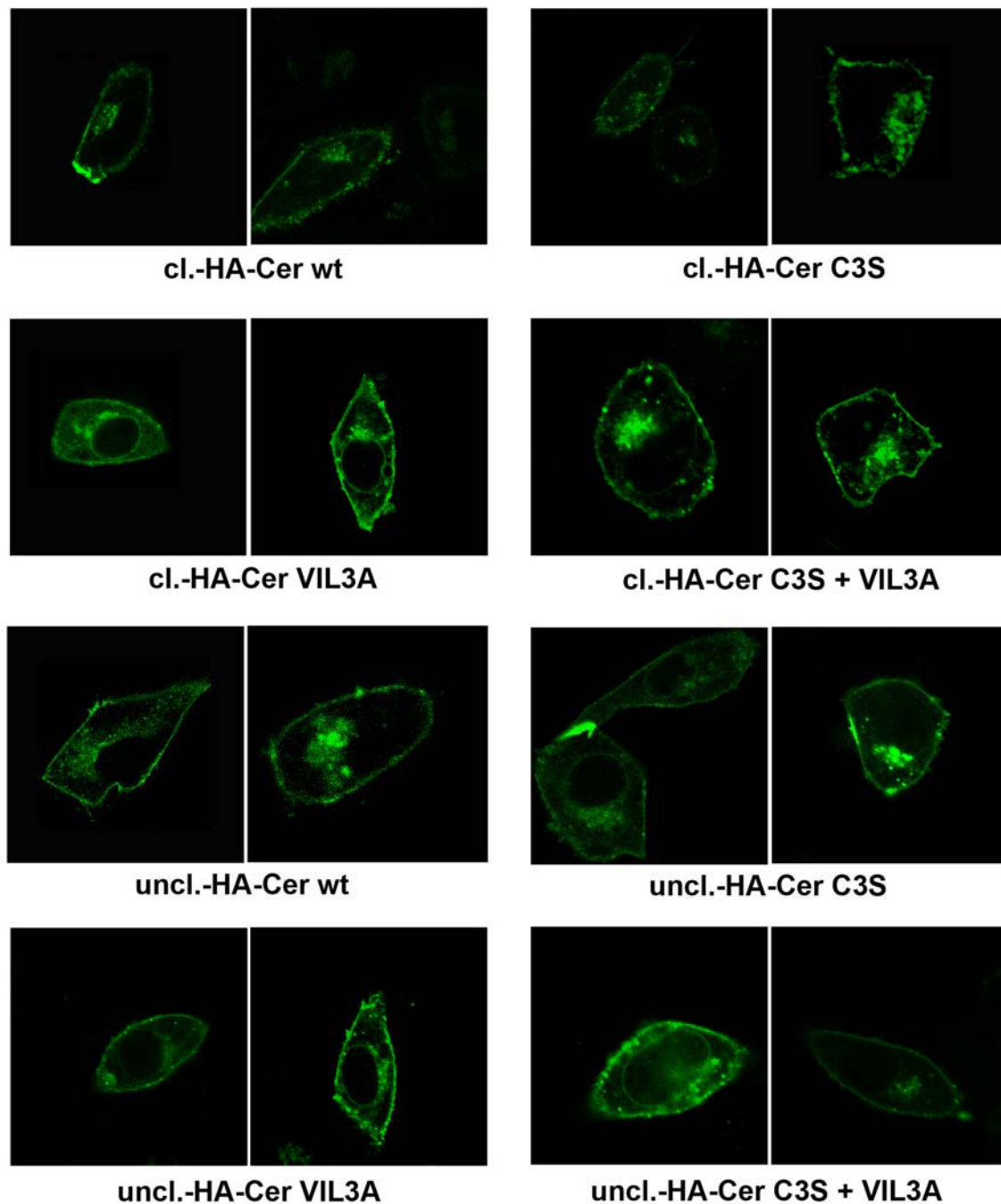
Nachdem biochemisch und konfokalmikroskopisch bestätigt wurde, dass der Linker L weder den Transport von HA noch die korrekte Faltung und damit die Fluoreszenzeigenschaften von Cerulean bzw. YFP beeinträchtigt, wurden insgesamt acht verschiedene HA-Konstrukte hergestellt. Alle Konstrukte wurden jeweils N-terminal sowohl in den YFP- als auch in den Cerulean-Vektor einkloniert. Für die biochemischen Analysen wurde aber ausschließlich das Cerulean-Konstrukt verwendet. Darüber hinaus unterscheiden sich Cerulean und YFP nur geringfügig durch den Austausch weniger Aminosäuren, und dies hat keinen Einfluss auf HA und die folgenden Messungen. Abbildung 24 stellt eine Übersicht der acht HA-Cerulean-Konstrukte dar. Hierbei handelt es sich um vier verschiedene HA-Mutanten, den Wildtyp (wt), die Palmitoylierungsmutante (C3S), die Transmembranmutante (VIL3A), bei der die ersten drei, sehr hydrophoben Aminosäuren der TMD durch Alanin ersetzt wurden, und die Doppelmutante (C3S + VIL3A), bei der beide Mutationen eingeführt wurden. Bei beiden Mutationen handelt es sich um Signale, die an der Raft-Lokalisation von HA beteiligt sein sollen. Im H3-Subtyp führen die einzelnen Mutationen zu einer stark verringerten Affinität zu den DRMs (Chen et al., 2005; Takeda et al., 2003). Der Effekt der Doppelmutante wurde bisher noch nie untersucht.



**Abbildung 24: Schematische Darstellung der HA-Cerulean-Konstrukte.** Alle Konstrukte sind durch den Linker L mit Cerulean (Cer) verbunden. Bei dem ungespaltenen HA (uncl.) wurde ein Arginin in der polybasischen Spaltstelle durch Glycin ersetzt. Dadurch findet keine Spaltung im TGN statt. Bei den gespaltenen Konstrukten (cl.) ist diese Spaltstelle noch intakt. C3S charakterisiert die Palmitilylierungsmutante, VIL3A bezeichnet einen Austausch der ersten drei Aminosäuren der Transmembranregion durch Alanin. Beide Mutationen gelten als Raft-Signal. Bei cl.-/uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A wurden beide Mutationen eingeführt. In grau ist die Plasmamembran dargestellt, wobei sich die extrazelluläre Seite oben und das Zytoplasma auf der Unterseite befinden.

Alle vier Konstrukte wurden als gespalten und ungespalten Variante kloniert, wobei die gespalten Form die natürliche polybasische Schnittstelle noch besitzt und die ungespalten einen Aminosäureaustausch erfahren hat (R339G), der diese Spaltstelle für zelluläre Proteasen unkenntlich gemacht hat. Extrazellulär lassen sich die ungespaltenen Konstrukte aber weiterhin durch Trypsin spalten (Vey et al., 1992). Die ungespaltenen Versionen wurden hergestellt, da vorherige Arbeiten gezeigt haben, dass HA, welches ohne das Vorhandensein weiterer viraler Komponenten exprimiert und intrazellulär gespalten wird, oft schon die pH-bedingte Konformationsänderung durchführt und dann in der fusionsinaktiven Form an die Plasmamembran transportiert wird (Takeuchi und Lamb, 1994).

Die Expression und Lokalisierung aller acht HA-Formen wurde mit Hilfe einer Transfektion von CHO-Zellen mit jeweils einem dieser Konstrukte überprüft. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, werden alle Konstrukte zur Plasmamembran transportiert, ohne dass ein Unterschied in der Lokalisation der Proteine feststellbar wäre.



**Abbildung 25: Konfokalmikroskopische Aufnahmen belegen, dass alle HA-Konstrukte in die Plasmamembran eingebaut werden.** Alle Konstrukte wurden transient in CHO-Zellen exprimiert. Diese Bilder zeigen typische Aufnahmen am Konfokalmikroskop. Die Fluoreszenz im Inneren der Zelle markiert den Golgi und auch das ER. Sehr helle Stellen an der Membran deuten darauf hin, dass hier Kontakt zu einer anderen Zelle besteht und HA hier an die Sialinsäure der benachbarten Zelle bindet.

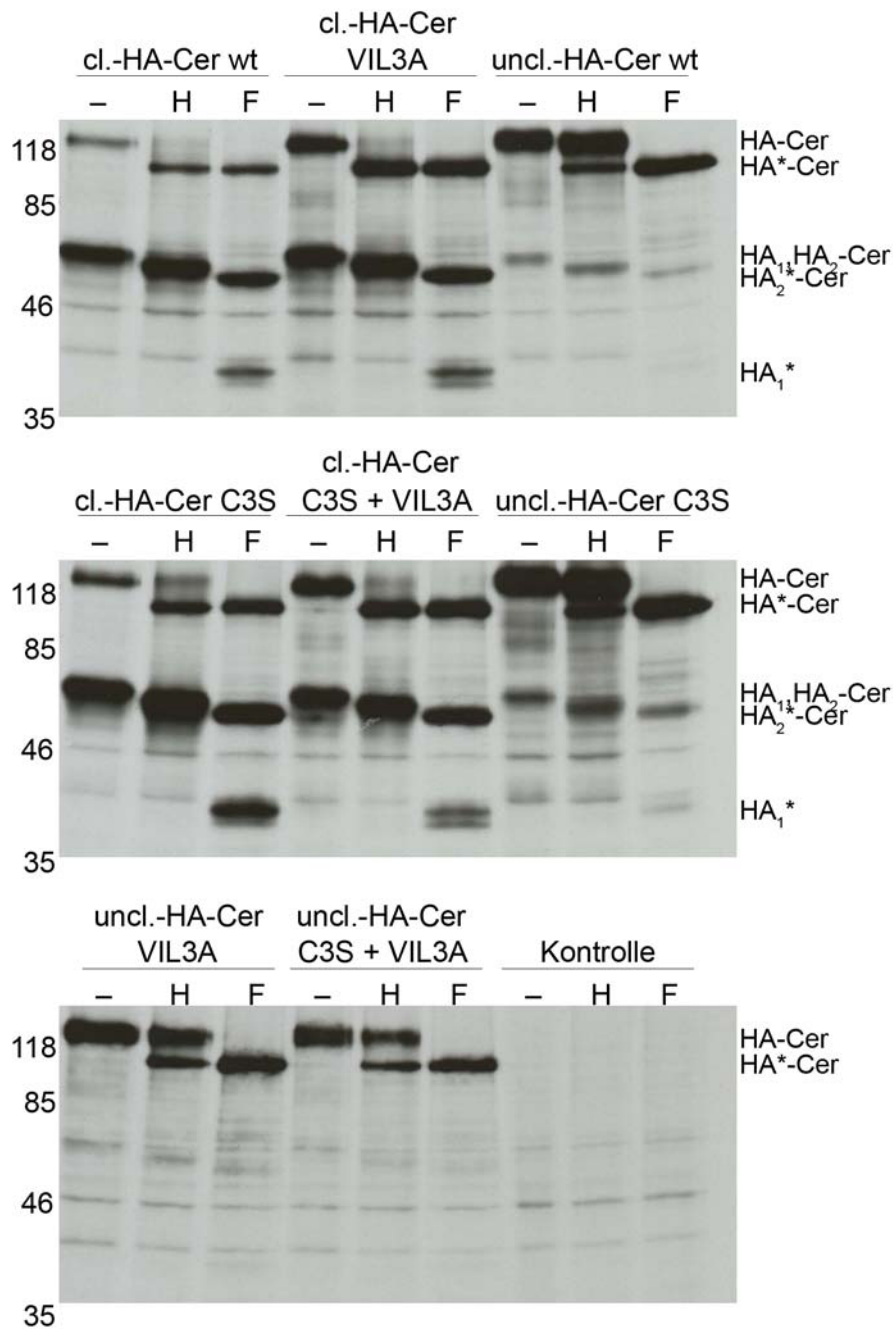
Neben den konfokalmikroskopischen Aufnahmen zur Kontrolle der Fluorophor-Funktionalität und des Einbaus der Proteine in die Plasmamembran wurde der Transport der HA-Konstrukte biochemisch durch einen Verdau mit Endo-H untersucht. Endo-H ist eine Endoglykosidase,

die alle Mannose-reichen Zuckerseitenketten eines Proteins abschneidet, jedoch keine Kohlenhydratketten vom komplexen Typ. Glykosylierungen vom komplexen Typ werden demnach als Endo-H resistent bezeichnet und entstehen während des Transports des Proteins durch den Golgi-Apparat. Im Gegensatz dazu schneidet die Glykosidase PNGase-F alle N-gebundenen Seitenketten ab und es kann somit überprüft werden, ob ein Protein grundsätzlich glykosyliert ist. Hierfür wurden CHO-Zellen mit diesen Konstrukte transient transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 4 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Die Ansätze wurden nach der Immunpräzipitation in drei Teilmengen aufgeteilt und jeweils mit Endo-H oder PNGase-F verdaut bzw. als Negativkontrolle nicht verdaut.

Das intrazellulär spaltbare Konstrukt cl.-HA-Cer wt lieferte hierbei ein für HA typisches Bandenmuster (Abb. 26 links oben). Da die Endo-H-Resistenz unmittelbar vor der Spaltung erlangt wird, ist in diesem Fall das ungespaltene HA auch Endo-H sensitiv ( $\text{HA}^*$ -Cer). Im Gegensatz dazu sieht man beim Vergleich der Kontrolle (–) mit der Endo-H (H)-verdauten Probe, dass die aus  $\text{HA}_1$  und  $\text{HA}_2$ -Cer bestehende Doppelbande ( $\text{HA}_1$ ,  $\text{HA}_2$ -Cer) etwas schneller im Gel gewandert ist, jedoch nicht so schnell wie im Fall des PNGase-F-Verdau. Dies liegt daran, dass HA fünf Endo-H-resistente und zwei Endo-H-sensitive Glykosylierungen besitzt (Keil et al., 1985). Somit werden im Endo-H-Verdau zwei Glykosylierungen verdaut. Durch die PNGase-F wurden alle Glykosylierungen abgespalten, und aus der Doppelbande entstanden zwei Banden, die die nicht-glykosylierten Untereinheiten  $\text{HA}_1^*$  und  $\text{HA}_2^*$ -Cer widerspiegeln.

Betrachtet man nun die intrazellulär nicht-spaltbare Mutante uncl.-HA-Cer wt, wird deutlich, dass hier, wie zu erwarten, nur ein sehr geringer Teil in die Untereinheiten  $\text{HA}_1$  und  $\text{HA}_2$ -Cer gespalten wurde (Abb. 26 rechts oben). Dies ist ein Beweis, dass der Aminosäureaustausch diese Spaltstelle für zelluläre Proteasen unkenntlich macht. Da nun ungespaltenes HA an die Plasmamembran transportiert wird, sollte dieses auch Endo-H-resistent ( $\text{HA}$ -Cer) sein. Im Fall von uncl.-HA-Cer wt ist ungefähr 90% resistent. Bei den restlichen 10% könnte es sich um HA handeln, das sich zum Zeitpunkt der Zelllyse noch im ER befunden hat und somit noch keine Endo-H-Resistenz erlangen konnte.

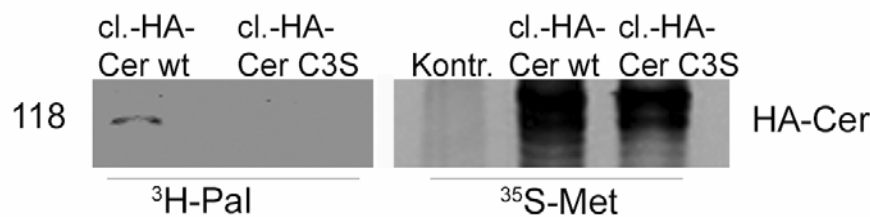




**Abbildung 26: Alle HA-Konstrukte werden korrekt prozessiert und zur Plasmamembran transportiert.** CHO-Zellen wurden mit den acht verschiedenen HA-Konstrukten transfiziert und für 4 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. HA wurde mit KP-Virus-Antiserum immunpräzipitiert und vor der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und Fluorographie mit Endoglykosidase H (H) bzw. Peptid-N-Glykosidase F (F) verdaut oder blieb unbehandelt (-). Der Molekulargewichtsmarker in kDa ist links dargestellt. HA-Cer ist das ungespaltene HA inklusive Glykosylierungen; HA\*-Cer ohne Glykosylierungen. HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub>-Cer ist die Doppelbande der beiden Untereinheiten inklusive aller, bzw. im Fall des Endo-H-Verdaus inklusive der Endo-H-resistenten Glykosylierungen. Bei HA<sub>1</sub>\* und HA<sub>2</sub>\*-Cer wurden durch die PNGase-F alle Glykosylierungen verdaut.

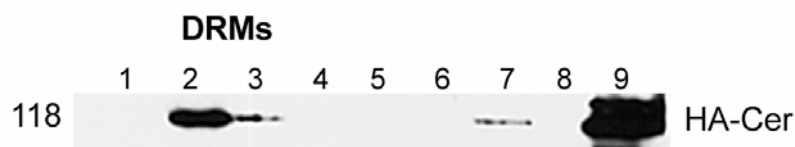
Der Verdau der Palmitylierungsmutanten cl.-HA-Cer C3S und uncl.-HA-Cer C3S zeigt deutlich, dass es in diesem Fall keinen Unterschied, bezüglich des Transport und der Prozessierung gibt wenn man sie mit den dazugehörigen Wildtyp-Konstrukten vergleicht (Abb. 26 mitte links und rechts). Die Mutation der ersten Aminosäuren der Transmembranregion hingegen scheint einen Einfluss auf die Endo-H-Resistenz oder aber die Transportgeschwindigkeit des Proteins zu besitzen (Abb. 26 oben mitte, unten links), denn vor allem im Fall von uncl.-HA-Cer VIL3A sieht man deutlich, dass nur ungefähr 50% der Endo-H-verdauten Probe auch resistent war. Dasselbe Bild erhielt man, beim Verdau der Doppelmutante uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A (Abb. 26 unten mitte). Bei den intrazellulär spaltbaren Formen cl.-HA-Cer VIL3A und cl.-HA-Cer C3S + VIL3A waren die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> zwar Endo-H-resistent, allerdings lag ein viel größerer Anteil als beim Wildtyp noch in der ungespaltenen, Endo-H-sensitiven Form vor (Abb. 26 oben mitte, mitte mitte). Anhand der hier gewonnenen Daten und auch durch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen lässt sich dennoch sagen, dass auch die TMD- und die Doppelmutante korrekt prozessiert an die Plasmamembran gelangen und für die hier angestrebten Untersuchungen mit Hilfe von FLIM-FRET verwendet werden können.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Palmitylierung trotz der Verbindung von HA mit dem Fluorophor stattfindet. Hierfür wurden die Konstrukte cl.-HA-Cer wt und cl.-HA-Cer C3S in CHO-Zellen exprimiert und je eine Probe mit <sup>3</sup>H-Palmitat bzw. <sup>35</sup>S-Methionin markiert und mit anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Schwefelmarkierung diente hierbei als Kontrolle, dass beide Konstrukte exprimiert wurden (Abb. 27 rechts). Die Palmitatmarkierung zeigt deutlich, dass das HA-Wildtyp-Konstrukt palmityliert wurde. Die Palmitylierungsmutante, die hier als Negativkontrolle fungierte, war dagegen, wie zu erwarten, nicht palmityliert (Abb. 27 links). Die Stärke der Palmitat-Bande im Falle des Wildtyps sagt dabei nichts über den Anteil der Proteine aus, die palmityliert wurden, denn Palmitat ist eine der häufigsten Fettsäuren, die in zelluläre Lipide eingebaut wird. Somit werden über 99% des radioaktiven Palmitats in diese Lipide inkorporiert und nur ein sehr geringer Anteil in das hier exprimierte HA-Konstrukt. Somit spricht allein die Detektion eines Signals schon dafür, dass man auf jeden Fall von einer erfolgreichen Palmitylierung ausgehen kann (Veit und Schmidt, 2006). Die Markierung mit <sup>35</sup>S-Methionin bestätigt dabei, dass beide Konstrukte ungefähr gleich stark exprimiert wurden.



**Abbildung 27: Die Palmitylierung von HA wird durch das Fluorophor nicht verhindert.** CHO-Zellen wurden mit cl.-HA-Cer wt bzw. cl.-HA-Cer C3S transfiziert und für 4 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin bzw.  $^3\text{H}$ -Palmitat markiert. Die  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Markierung dient als Kontrolle für die Transfektion und Expression der Konstrukte. Nach der Immunpräzipitation mit anti-GFP wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt. Kontr. = nicht transfizierte Zellen. Molekulargewichtsbande ist links in kDa dargestellt.

Bisherige Experimente zur Lokalisation von HA in Rafts beruhen vor allem auf Triton-basierenden Versuchen (Barman et al., 2004; Carrasco et al., 2004; Fiedler et al., 1993). Deshalb wurde auch hier die Affinität von fluoreszenzmarkiertem HA zu DRMs beispielhaft an cl.-HA-Cer wt untersucht. Mit Hilfe eines Sucrosegradienten wurden die DRMs von den restlichen Membranen getrennt, und mittels einer Immundetektion konnte gezeigt werden, dass, wie densitometrisch mit ImageJ ausgewertet, ungefähr 27% von cl.-HA-Cer wt in DRMs eingebaut wird (Abb. 28). Dieses Ergebnis ähnelt den Resultaten früherer Studien, die mit HA ohne Fluorophor erzielt wurden. Hier wurde unter anderem gezeigt, dass ohne ein polares Wachstum der Zellen nur wenig HA in DRMs vorkommt (Lin et al., 1998; Skibbens et al., 1989).



**Abbildung 28: Triton-Extraktion mit cl.-HA-Cer wt zeigt DRM-Lokalisation.** Transient transfizierte CHO-Zellen wurden mit 1% Triton X-100 lysiert und über einen Sucrosegradienten aufgereinigt. Die Immundetektion erfolgte mit anti-GFP-Antikörpern. Die Fraktionen 2 und 3 repräsentieren die DRMs, 7 bis 9 spiegeln die HA-Konzentration im restlichen Zelllysate wider.

Zusammenfassend haben die hier durchgeführten Experimente gezeigt, dass alle später verwendeten HA-Konstrukte die gleiche Glykosylierung besitzen wie unmarkiertes HA und an die Plasmamembran gelangen. Des Weiteren werden alle spaltbaren Konstrukte intrazellulär

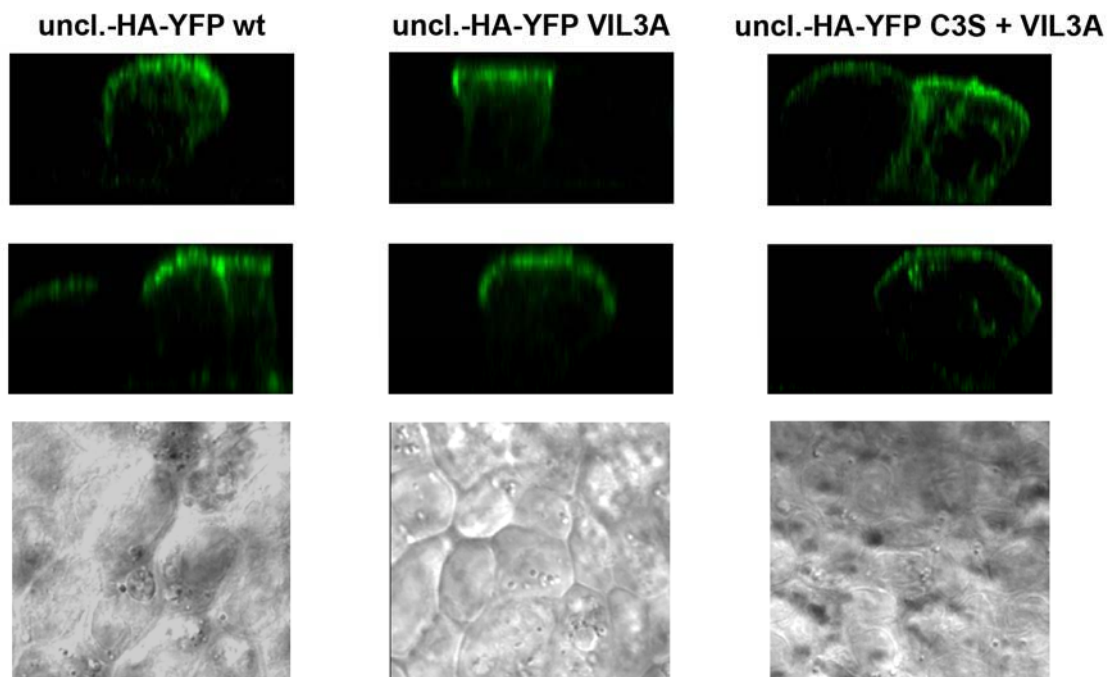
gespalten, und der Wildtyp des H7-Subtyps ist palmitoyliert und wird teilweise in DRMs eingebaut.

### **5.3 Die Deletion des DRM-Signals der Transmembranregion verzögert den Transport von HA zur Plasmamembran**

Der exocytische Transport von HA beginnt im ER mit der Faltung, Trimerisierung, Palmitoylierung und Kernglykosylierung der Proteine. Im Golgi erfolgt dann die Modifizierung der Kohlenhydratseitenketten bis hin zum komplexen Typ. Außerdem wird HA in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten. Da HA seine Detergens-Resistenz im Trans-Golgi-Netzwerk erlangt (Skibbens et al., 1989), ist davon auszugehen, dass sich die Membran-Rafts entweder hier bilden oder dass HA hier in die Rafts eingebaut wird. Diese Rafts könnten dann als Transportvesikel der Proteine an die Plasmamembran dienen. Zumindest für polarisierte Zellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die Membran-Rafts vom TGN abschnüren und als Vesikel den Transport zur apikalen Plasmamembran bewerkstelligen (Keller und Simons, 1998).

Bei der Charakterisierung des fluoreszenzmarkierten HAs konnte gezeigt werden, dass alle Konstrukte richtig prozessiert und an die Plasmamembran transportiert werden. Die Experimente haben jedoch auch Hinweise dafür geliefert, dass die Mutation der Transmembrandomäne zu einem verzögerten Transport dieser Proteine führt. Diese Beobachtungen sollen im Folgenden genauer untersucht werden.

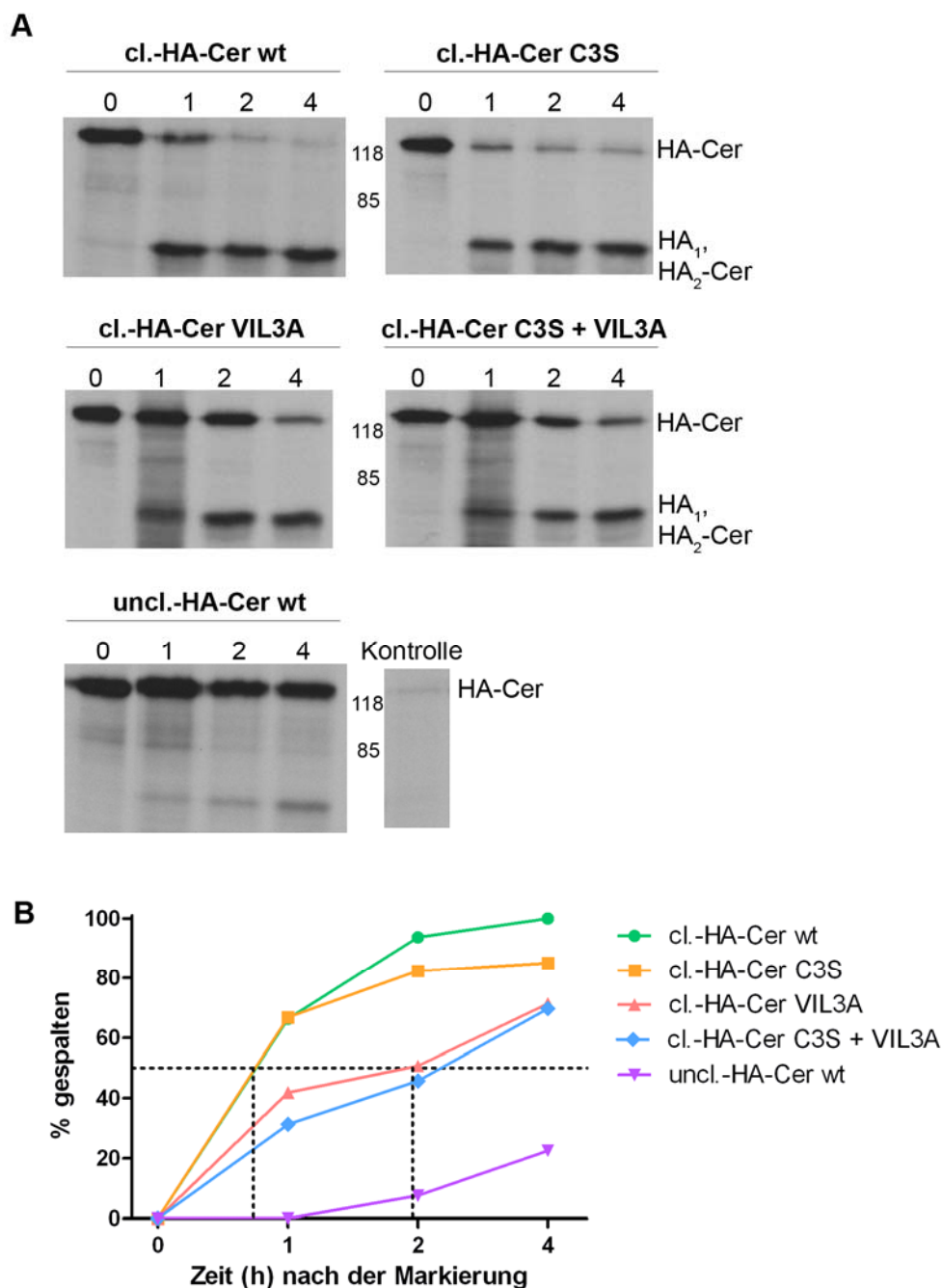
Zu Beginn wurde überprüft, ob diese verlangsamte Prozessierung der TMD-Mutanten auch einen Einfluss auf deren Transport in polar wachsenden Zellen ausübt. Hierfür wurde die Membranlokalisation von uncl.-HA-Cer wt in polar wachsenden MDCK-II-Zellen mit der Lokalisation von uncl.-HA-Cer C3S und uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A verglichen. Für die Ausbildung eines polaren Wachstums wurden die MDCK-II-Zellen auf sogenannten Transwells, wie in Material und Methoden beschrieben, ausgesät. Um sicherzustellen, dass die Zellen am Ende des Versuchs auch polares Wachstum ausgebildet haben, wurden sie 15–18 Tage auf den Transwells kultiviert, bevor die Membranlokalisation der HA-Proteine mit Hilfe des Konfokalmikroskops analysiert wurde.



**Abbildung 29: Die TMD-Mutanten werden wie der Wildtyp an die apikale Membran transportiert.** MDCK-II-Zellen wurden auf Transwells ausgesät und mit uncl.-HA-Cer wt, VIL3A bzw. C3S + VIL3A transfiziert. Damit die Zellen polares Wachstum ausbilden, wurden sie für 15–18 Tage auf dieser PET-Membran kultiviert. Diese wurde dann aus dem Transwell herausgeschnitten, die Lokalisation daraufhin am Konfokalmikroskop untersucht. Es wurde ein z-Stack der Zellen erstellt und dann mit Hilfe eines 3D-Programmes ein Schnitt in z-Richtung durch die Zellen generiert. Die grüne Linie am unteren Ende der Zelle ist die Autofluoreszenz der PET-Membran. In der letzten Reihe sind außerdem exemplarisch Differential-Interferenz-Kontrastbilder gezeigt, um zu verdeutlichen, dass nur wenige Zellen transfiziert waren, es sich aber trotzdem um einen dichten Zellrasen handelte. Diese Bilder stellen einen Schnitt in der xy-Ebene der Zellen dar, da eine Aufnahme in z-Richtung kein Bild liefert, das Strukturen und einzelne Zellen erkennen lässt.

Das Wildtypprotein uncl.-HA-Cer wt wurde dabei nahezu ausschließlich an die apikale Membran transportiert, und auch uncl.-HA-Cer VIL3A war fast nur an der apikalen Membran detektierbar (Abb. 29), und obwohl ein geringer Teil von uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A auch an der lateralen Membran zu sehen war, war auch hier der Großteil an der apikalen Membran lokalisiert (Abb. 29 rechts). Da die Transfektionsrate hierbei sehr gering war, kann anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme keine Aussage über die Konfluenz des Zellrasens getroffen werden. Die Differential-Interferenz-Kontrastbilder (DIC) belegen jedoch, dass es sich hierbei um eine einheitliche Zellschicht handelte (Abb. 29 unten). Diese Bilder sind als Schnitt in der xy-Ebene dargestellt, da ein Schnitt in z-Richtung kein Bild liefert, bei dem die Zellstrukturen erkennbar wären. Die Bilder belegen, dass zwar die Transfektionsrate nicht sehr hoch war, es sich aber um einen dichten Zellrasen handelte.

Einer der letzten Schritte des Transports von HA durch den Golgi, die intrazelluläre Spaltung, wurde anschließend genauer betrachtet. Hierfür wurde ein Pulse-Chase-Experiment mit den durch Furin spaltbaren HA-Konstrukten (cl.) durchgeführt. Dabei wurden die Proben für 30 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und dann zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Markierung lysiert. So konnte die Zeit bestimmt werden, die die einzelnen Konstrukte für den Transport durch das ER und den Golgi benötigen, um dann im TGN durch Furin gespalten zu werden (Abb. 30 A). Die hierbei detektierten Banden wurden mit Hilfe von ImageJ densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt (Abb. 30 B).

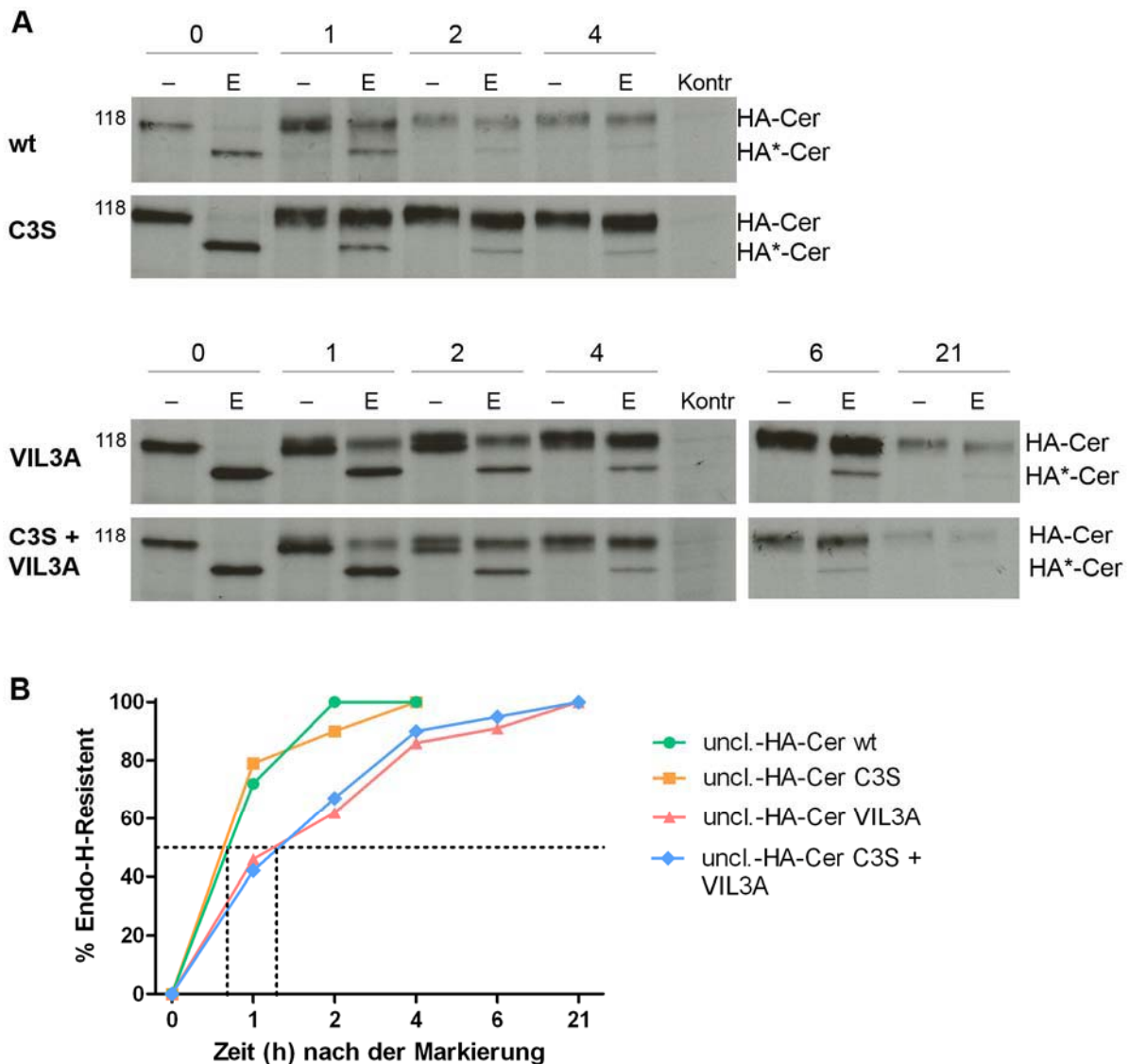


**Abbildung 30: Die TMD-Mutanten werden langsamer prozessiert als der Wildtyp. A:**

Die CHO-Zellen wurden mit den HA-Konstrukten transfiziert und für 30 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und entweder sofort lysiert (0 h) oder für 1, 2 bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit KP-Antiserum, und anschließend wurden die Proben unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt. uncl.-HA-Cer wt ist die Kontrolle, die nicht gespalten werden sollte. HA-Cer = ungespaltenes HA, HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub>-Cer = die gespaltenen Untereinheiten von HA. Molekulargewichtsbanden (kDa) sind in der Mitte dargestellt. **B:** Graphische Darstellung der Spaltung von A. % gespalten =  $[(\text{HA}_1 + \text{HA}_2\text{-Cer}) / ((\text{HA}_1 + \text{HA}_2\text{-Cer}) + \text{HA-Cer})] \times 100$  für jeden Zeitpunkt bei den einzelnen Konstrukten.

Die Auswertung von cl.-HA-Cer wt zeigt dabei, dass die Hälfte der Proteinpopulation schon nach 45 min in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer gespalten wurde (Abb. 30 A oben links, B). Nach zwei Stunden waren schon ungefähr 90% und nach vier Stunden nahezu alle Moleküle gespalten. Diese Werte sind vergleichbar mit HA, welches nicht mit einem Fluorophor markiert wurde (Roberts et al., 1993). Im Gegensatz dazu lag uncl.-HA-Cer wt, welches keine Spaltstelle für die intrazelluläre Spaltung mehr besitzt, wie zu erwarten, nur zu einem sehr geringen Teil als HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer vor. Weiter zeigt der Vergleich der Palmitilylierungsmutante mit dem Wildtyp, dass der Unterschied zwischen den beiden nur sehr gering ausfällt (Abb. 30 A, B). Wenn man hingegen die TMD-Mutanten betrachtet, stellt man fest, dass die Halbwertszeit hier bei zwei Stunden lag. Nach vier Stunden betrug der gespaltene Anteil ungefähr 70%. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die TMD-Mutanten langsamer transportiert werden.

Als Nächstes wurde die Auswirkung dieser Mutation auf die Modifikation der Glykosylierungen von HA untersucht. Dabei entstehen fünf Glykosylreste vom komplexen Typ, welche dann Endo-H-resistent sind. Für diese Endo-H-Resistenz-Experimente wurden die ungespaltenen Formen von HA verwendet. Die Proben wurde nach Markierung mit radioaktivem Schwefel in nur zwei Ansätze aufgeteilt, die Kontrolle und die Endo-H-verdaute Probe, da ein Verdau mit der PNGase-F, wie in Abbildung 26, vor allem dazu dient, zu zeigen, dass alle Glykosylreste verdaut werden können, was zu einer Verringerung der relativen molaren Masse des Proteins führt. Die Zelllyse erfolgte beim Wildtyp und der Palmitilylierungsmutante 0, 1, 2 und 4 h nach der Radioaktivmarkierung. Bei der TMD- und der Doppelmutante wurden zwei weitere Proben für 6 bzw. 21 h inkubiert, um zu zeigen, dass die Glykosylierungsmodifikationen zwar langsamer ablaufen, aber insgesamt auch vollständig durchgeführt werden (Abb. 31).



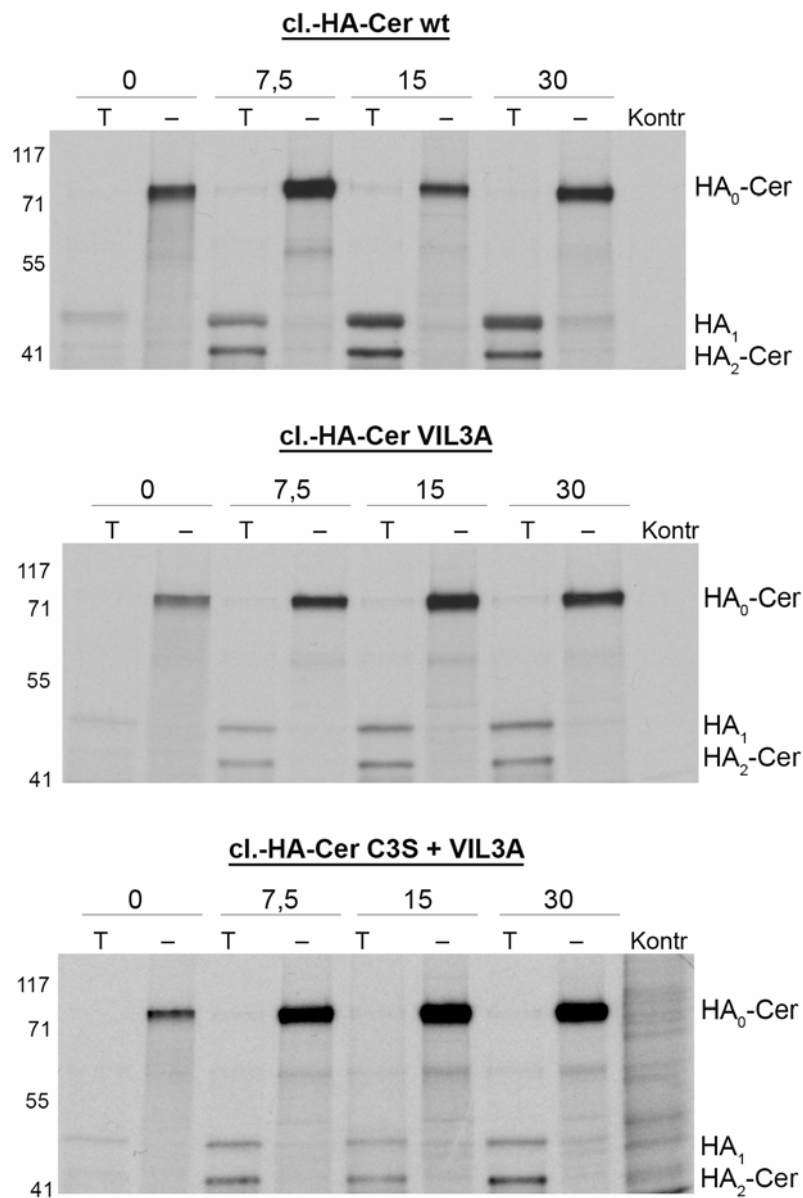
**Abbildung 31: Die Mutation der TMD verlangsamt den Transport von HA schon im Golgi-Apparat.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-Cer wt/C3S/VIL3A/C3S+VIL3A transfiziert und für 30 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Die Zellyse fand 0, 1, 2 und 4 h bzw. 0, 1, 2, 4, 6 und 21 h nach der Markierung statt. Nach der Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörper wurden die Proben unter reduzierenden Bedingungen mit Endo-H (H) verdaut oder blieben unbehandelt (-). Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Gel. **A:** HA-Cer ist die Endo-H-resistente Form bzw. wurde nicht verdaut, HA\*-Cer symbolisiert verdautes HA. Kontr symbolisiert das Bandenmuster nicht-transfizierter Zellen. Molekulargewichtsbanden (kDa) auf der linken Seite. **B:** Densitometrische Auswertung der detektierten Banden und prozentuale Darstellung der schon resistenten Proteine. %-Endo-H-resistent =  $(\text{HA}^*\text{-Cer}/(\text{HA-Cer}+\text{HA}^*\text{-Cer})) \times 100$  der Endo-H-verdauchten Proben zu jedem Zeitpunkt.



Die densitometrische Auswertung der radioaktiv-markierten Proteine zeigt, dass die Halbwertszeit für die Endo-H-Resistenz des Wildtyps wie auch der Palmitylierungsmutante bei ungefähr 40 min liegt, bei der TMD- und der Doppelmutante beträgt die Halbwertszeit allerdings 80 min. Die vollständige Prozessierung der Glykosylreste ist hierbei beim Wildtyp nach 4 h erfolgt, bei der TMD-Mutante erst nach mehr als 6 h (Abb. 31 B). Demnach macht sich auch schon bei der Prozessierung der Kohlenhydratseitenketten im Golgi eine Verzögerung des Transports durch den Austausch der ersten drei Aminosäuren der Transmembranregion bemerkbar.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Mutation der TMD zu einem verzögerten Transport der Konstrukte durch den Golgi führt. Abschließend soll nun noch untersucht werden ob dies damit zusammenhängt, dass der oft geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Prozessierung von Proteinen, die Faltung und in diesem Fall auch die Trimerisierung für diese Verzögerung verantwortlich sind. Hierfür wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt und die Proben anschließend mit Trypsin verdaut. Bei diesem Verdau wird

HA, welches noch als Monomer vorliegt vollständig abgebaut, die Trimere werden dagegen in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer gespalten. Da sowohl in Abbildung 30 als auch 31 deutlich wird, dass die Mutation der Palmitylierung keinen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit der Proteine besitzt wurden die CHO-Zellen für dieses Experiment nur mit den Konstrukten cl.-HA-Cer wt, cl.-HA-Cer VIL3A und cl.-HA-Cer C3S + VIL3A transfiziert. Durch den Vergleich der drei Konstrukte wurde ersichtlich, dass die Trimerbildung in allen drei Fällen gleich schnell erfolgt (Abb. 32). Betrachtet man das Bandenmuster der drei Proben nach 0 min Chase sieht man, dass in der unverdauten Kontrolle (–) HA vorhanden ist, dies jedoch in der Trypsin-verdauten Spur (T) nahezu komplett verdaut wurde. In den verdauten Proben nach 7,5 min Chase war HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer schon erkennbar. Weiterhin zeigte dieser Versuch, dass die Signalstärke von HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer nach 30 min Chase im Vergleich zu den Proben nach 15 min nicht mehr zunahm (Abb. 32). Man kann also davon ausgehen, dass hier bereits der gesamte Proteinanteil als Trimer vorlag. Die Trimerbildung ist also nicht der Prozessierungsschritt der zu dem verzögerten Transport der Transmembranmutante führt. Demnach findet der verzögerungsauslösende Schritt erst im Golgi statt.

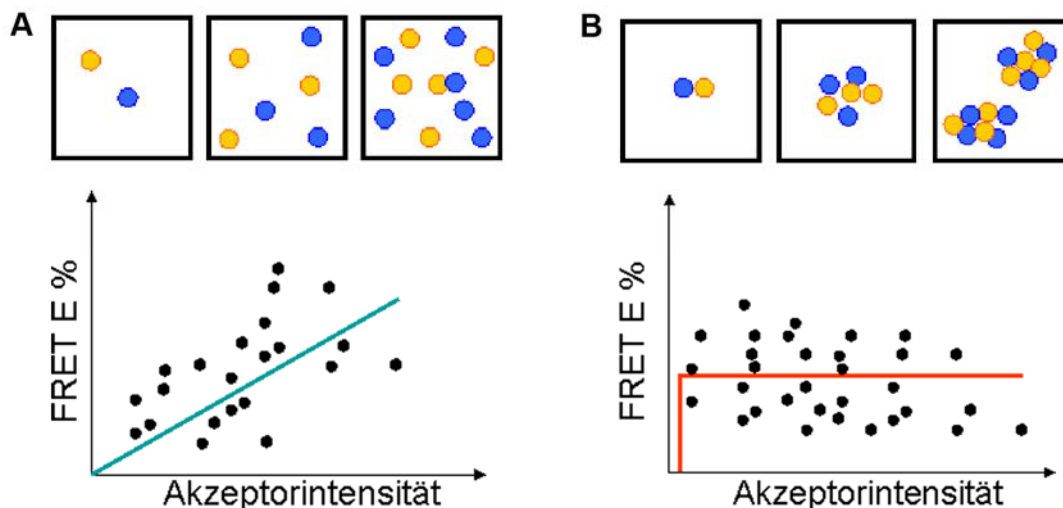


**Abbildung 32: Die Trimerbildung findet bei allen Konstrukten gleich schnell statt.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-Cer wt/VIL3A/C3S+VIL3A transfiziert und für 3 min mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Die Zellyse fand 0, 7,5, 15 und 30 min nach der Markierung statt. Anschließend wurden die Proben in zwei Ansätze aufgeteilt und mit 5 µg/ml Trypsin für 2 min bei RT verdaut (T) oder blieben unbehandelt (-) und die Reaktion dann mit dem Trypsin-Inhibitor Soybean gestoppt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit KP-Antiserum und die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt. HA<sub>0</sub>-Cer wurde nicht verdaut, HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer symbolisieren Trimere die durch den Verdau mit Trypsin in die Untereinheiten gespalten wurden. Kontr symbolisiert das Bandenmuster nicht-transfizierter Zellen. Molekulargewichtsbanden (kDa) auf der linken Seite.

## 5.4 Untersuchung der Raft-Affinität von ungespaltenem HA

Die Raft-Affinität von fluoreszenzmarkiertem HA kann mit Hilfe der FLIM-FRET-Methode in lebenden Zellen untersucht werden, ohne dass der Einsatz von Antikörpern nötig ist, der zu einer Veränderung der HA-Verteilung, zum Beispiel durch „Crosslinking“, führen könnte (Ritchie und Kusumi, 2003). Der Vorteil einer FLIM-abhängigen Messung des Energietransfers ist, dass die Messung nicht von der Konzentration der Proteine in der Zelle abhängt und dass keine Korrekturberechnungen wie bei anderen FRET-Techniken nötig sind (Wallrabe und Periasamy, 2005). Die ansonsten am meisten verwendete Methode, bei der selektiv der Akzeptor gebleicht wird und dabei der Anstieg der Donorintensität nach dem Bleichen ermittelt wird (Akzeptorphotobleichen), ist darüber hinaus nicht für Messungen an lebenden Zellen geeignet (Wallrabe und Periasamy, 2005). FLIM-FRET vergleicht die Lebenszeit eines Donor-Proteins bei An- bzw. Abwesenheit des Akzeptors. Wenn beide Proteine weniger als 10 nm voneinander entfernt in der Zelle lokalisiert sind, findet strahlungsfreier Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor statt, und die Lebenszeit des Donors wird somit verkürzt. Aus dem Verhältnis dieser beiden Lebenszeiten lässt sich anschließend die FRET-Effizienz (E%), wie in Material und Methoden beschrieben, berechnen. Durch die freie Beweglichkeit der Proteine in der Plasmamembran besteht auch die Möglichkeit, dass sie sich zufällig treffen und so Energietransfer stattfindet (Glebov und Nichols, 2004; Kenworthy und Edidin, 1998; Kenworthy et al., 2000). Um zu verhindern, dass dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt (Silvius und Nabi, 2006), wurde eine systematische Analyse der Daten erforderlich. Hierfür wurde die Intensität des Akzeptors an der Plasmamembran, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt und in die Berechnung miteinbezogen. Dabei wurde nach Zacharias et al. eine Ligand-Rezeptor-Bindungsbeziehung für die beiden zu untersuchenden Proteine angenommen, die Daten wurden dann mittels des einseitigen, gesättigten Bindungsmodells angepasst (siehe Material und Methoden) (Zacharias et al., 2002). Dabei wird untersucht, ob der gemessene Energietransfer darauf zurückzuführen ist, dass zwei Proteine in einer Beziehung zueinander stehen, oder ob der Energietransfer bei einem zufälligen Treffen der beiden Proteine stattgefunden hat. Handelt es sich um ein zufälliges Treffen, so ist die FRET-Effizienz abhängig von der Akzeptorintensität, denn je mehr Akzeptor vorhanden ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die beiden Proteine treffen und das Energietransfer stattfindet (Abb. 33 A). Die dabei aus der Gleichung resultierende Dissoziationskonstante  $K_D$  liegt in diesem Fall im Bereich der Akzeptorintensität. Stehen die beiden Proteine dagegen in einer Verbindung zueinander, zum Beispiel dadurch, dass sie als Rezep-

tor-Ligand-Paar aneinander binden, oder dass beide Proteine in Rafts eingebaut werden, dann ist die FRET-Effizienz unabhängig von der Akzeptorintensität, denn auch schon bei kleinen Konzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die beiden Proteine nicht nur zufällig gemeinsam auf engstem Raum vorkommen, wodurch Energietransfer stattfindet (Abb. 33 B). Die zugehörige  $K_D$  ist in diesem Fall kleiner als der Intensitätsbereich des Akzeptors.

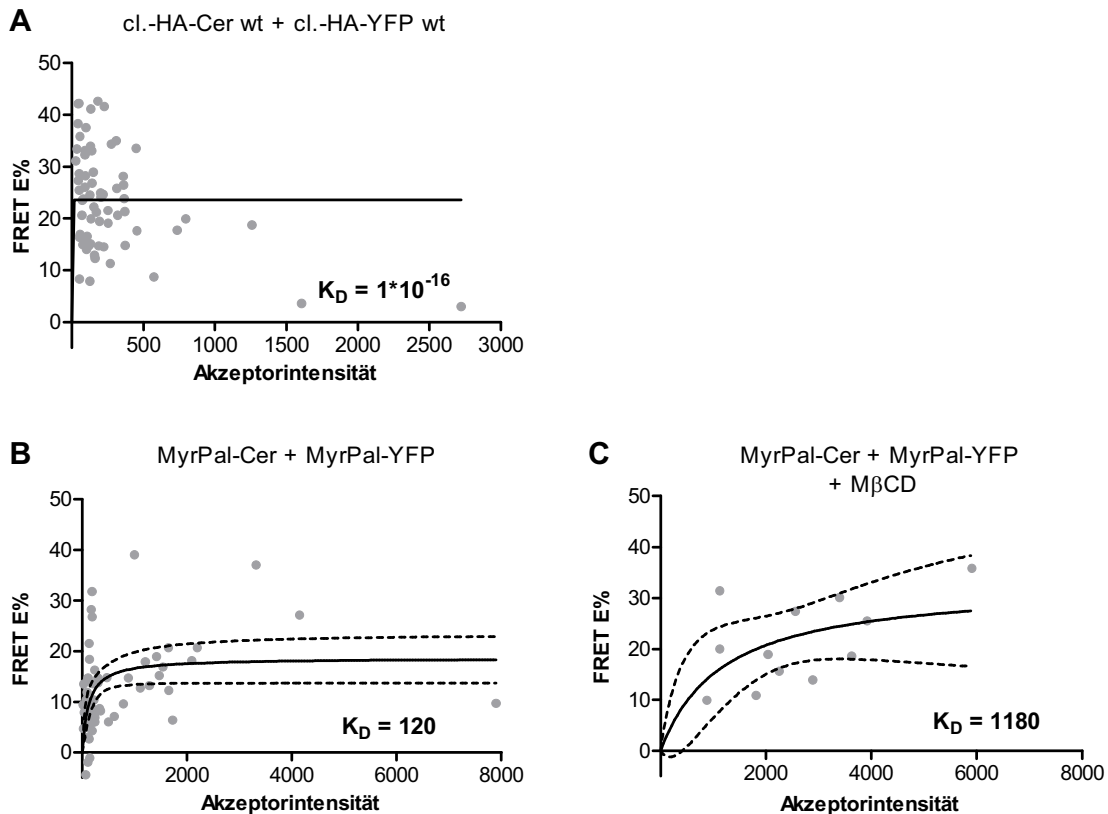


**Abbildung 33: Theoretisches Modell für die Auswertung von FLIM-FRET für zwei geklusterte bzw. nicht geklusterte Proteine.** **A:** Zwei Proteine, die frei in der Plasmamembran diffundieren, treffen sich umso häufiger, je höher die Konzentration der beiden in der Membran ist. Dabei ist die FRET-Effizienz abhängig von der Akzeptorintensität. **B:** Binden zwei Proteine aneinander, oder kommen sie in gemeinsamen Domänen, wie Rafts, vor, so ist die FRET-Effizienz unabhängig von der Konzentration der Proteine. Darstellung nach Zacharias et al. 2002.

#### 5.4.1 Kontrollexperimente zur Evaluierung der FLIM-FRET-Methode für die Untersuchung der Raft-Affinität von HA

Eine Voraussetzung für den Transport von HA an die Plasmamembran ist die Bildung von HA-Trimern im ER (Copeland et al., 1986). Hierbei entstehen bei der Koexpression von HA-Cerulean und HA-YFP sowohl Trimere, die nur Cerulean bzw. YFP enthalten, als auch gemischte Trimere. Im Fall eines gemischten Trimers ist der Abstand der beiden Fluorophore sehr gering, da der C-Terminus von HA aus nur 11 und der Linker aus nur 15 Aminosäuren besteht. Diese Koexpression sollte demnach zur Bildung eines starken Klusters führen und kann somit zur Evaluierung der FLIM-FRET-Methode verwendet werden. Cl.-HA-Cer wt und cl.-HA-YFP wt wurden coexprimiert, und Abbildung 34 A zeigt, dass die FRET-Effizienz in

diesem Fall vollkommen unabhängig von der Akzeptorkonzentration ist. Der  $K_D$ -Wert ist mit  $1 \times 10^{-16}$  wesentlich kleiner als der Intensitätsbereich des Akzeptors, und die Anpassungsfunktion bildet dabei sehr schnell ein Plateau aus. Dieses Ergebnis beschreibt demnach sehr gut die räumliche Nähe von cl.-HA-Cerulean wt und cl.-HA-YFP wt und bestätigt dabei, dass sich gemischte Trimere ausbilden. Außerdem zeigt dies, dass die Methode funktioniert.



**Abbildung 34: FLIM-FRET ist eine sinnvolle Methode für die Bestimmung der Raft-Affinität von HA.** Für jede Donor und Akzeptor exprimierende CHO-Zelle wurde die FRET-Effizienz (E%) gegen die Akzeptorintensität aufgetragen. — = Die Daten wurden mit dem gesättigten, einseitigen Bindungsmodell, wie in Material und Methoden beschrieben, angepasst. --- beschreibt das 95%-Konfidenzintervall.  $K_D$  = Dissoziationskonstante, die die Assoziationseigenschaften beschreibt. **A:** Koexpression von cl.-HA-Cer wt und cl.-HA-Cer YFP; n (Anzahl der vermessenen Zellen): 66,  $K_D$ :  $1 \times 10^{-16} \pm 7$ . **B und C:** Koexpression von MyrPal-Cer und MyrPal-YFP. **B:** unbehandelte Zellen; n: 58,  $K_D$ :  $120 \pm 57$ . **C:** Behandlung mit 5 mM M $\beta$ CD, 30 min, 37 °C; n: 12,  $K_D$ :  $1180 \pm 1188$ .

Zusätzlich zur Koexpression von HA-Cerulean und HA-YFP wurde die FLIM-FRET-Methode anhand der Koexpression von MyrPal-YFP und MyrPal-Cer, dem in dieser Arbeit verwendeten Raft-Marker, getestet. Beide Konstrukte sollten in Rafts lokalisiert sein und demnach ebenfalls zu einem Ergebnis führen, bei dem die FRET-Effizienz unabhängig ist von

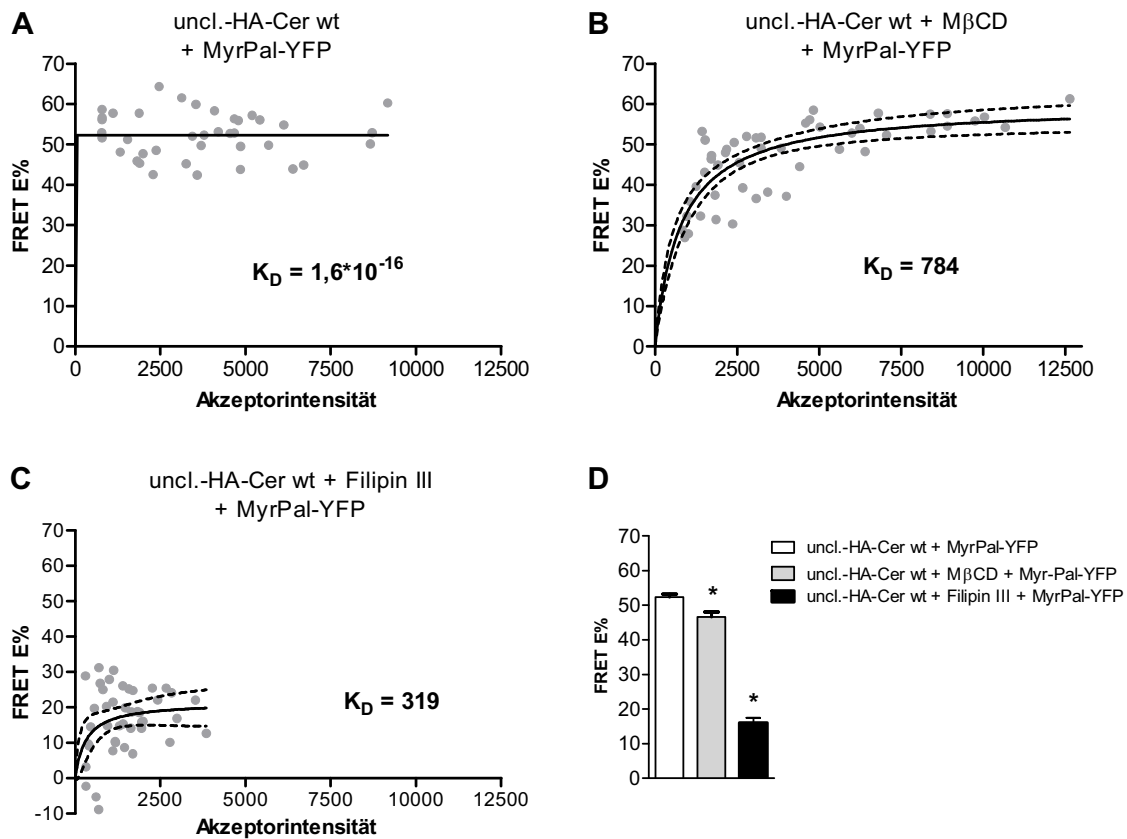
der Akzeptorintensität. Die schnelle Ausbildung des Plateaus in Abbildung 34 B und der im Vergleich zum Intensitätsbereich des Akzeptors geringeren  $K_D$ -Wertes deutet darauf hin, dass beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorkommen. Darüber hinaus wurde den MyrPal-YFP und MyrPal-Cer exprimierenden Zellen Cholesterin durch die Behandlung mit M $\beta$ CD entzogen, um zu überprüfen, ob das Resultat aus Abbildung 34 B auf der Inkorporation beider Proteine in Rafts beruht. Der Cholesterinentzug dieser Zellen führt dabei zu einem Anstieg der  $K_D$  um das Zehnfache (Abb. 34 C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Raft-Marker-Kluster auf das gemeinsame Vorkommen in Membran-Rafts zurückzuführen ist. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse, die anhand von FRET-Messungen durch Akzeptorphotobleichen mit einem myristylierten und palmitylierten Raft Marker erzielt wurden (Zacharias et al., 2002). Der Unterschied der  $K_D$ -Werte bei der Koexpression von HA und HA bzw. MyrPal und MyrPal kann mehrere Ursachen haben. Zum einen können Kluster, die eigentlich ein Trimer beschreiben, deutlich stärker sein als der Einbau zweier Proteine in Rafts. Zum andern sind die  $K_D$ -Werte unterschiedlicher Donoren nicht miteinander vergleichbar, da verschiedene Faktoren, wie die Art der Verknüpfung oder der Winkel, welcher ein Fluorophor durch diese Verbindung einnimmt die Lebenszeit und die Effizienz des Energietransfers entscheidend beeinflussen kann. Diese Ergebnisse zeigen dennoch, dass die Raft-Assoziation eines Proteins mit Hilfe von FLIM-FRET untersucht werden kann.

#### 5.4.2 HA-Kluster mit dem Raft-Marker sind Cholesterin-abhängig

Die polybasische Schnittstelle des H7-Subtyps von HA wird intrazellulär von Furin in die durch Disulfidbrücken verbunden Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten. Wird HA dabei zusammen mit den anderen viralen Proteinen in der Zelle exprimiert, sorgt der M2-Ionenkanal für einen neutralen pH im TGN, sodass das gespaltene HA nicht in die fusionsinaktive Konformation übergeht. Studien mit HA, welches allein in Zellen exprimiert wurde, zeigten, dass in diesem Fall bis zu 85% der an der Plasmamembran exponierten HA-Proteine in der fusionsinaktiven Konformation vorliegen (Ohuchi et al., 1994; Takeuchi und Lamb, 1994). Aus diesem Grund wurden für die Experimente, die die Raft-Affinität von HA in lebenden Zellen untersuchten, nur HA-Formen verwendet, bei denen die Spaltstelle mutiert worden war (uncl.).

Die Koexpression von uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP resultierte in einer FRET-E%-Verteilung, die vollkommen unabhängig von der Akzeptorintensität war (Abb. 35 A). Dies

wird zum einen durch die schnelle Ausbildung des Plateaus als auch durch die sehr niedrige  $K_D$  ( $6 \times 10^{-8}$ ) deutlich. Demnach liegen HA und der Raft-Marker in enger räumlicher Nähe in der Plasmamembran vor.



**Abbildung 35: HA klustert Cholesterin-abhängig mit dem Raft-Marker.** FLIM-FRET wurde wie in Abb. 34 beschrieben ausgewertet. **A–C:** Koexpression von uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP **A:** unbehandelte Zellen; n: 39,  $K_D: 1,6 \times 10^{-16} \pm 48$ . **B:** Behandlung mit 5  $\mu$ g/ml Filipin III, 30 min, 37 °C; n: 43,  $K_D: 319 \pm 266$ . **C:** Behandlung mit 10 mM M $\beta$ CD, 30 min, 37 °C; n: 48,  $K_D: 784 \pm 139$ . **D:** Mittelwert der FRET-Effizienz (E%) für die Experimente A–C. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* =  $P < 0,01$ , im Vergleich zu A, berechnet mit dem ungepaarten, einseitigen t-Test.

Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin und Filipin III entziehen der Zelle Cholesterin, und damit sollte geprüft werden, ob es sich bei den Klustern aus HA und MyrPal um Rafts handelt. Das bei dieser Behandlung toxisch wirkende Filipin III (Abb. 14) hatte dabei einen geringeren Einfluss als M $\beta$ CD (Abb. 35 B). Die Inkubation mit M $\beta$ CD schadete den Zellen indes nicht, was unter anderem daran zu erkennen war, dass sich die Zellen im Phänotyp nicht von unbehandelten Zellen unterschieden hatten. M $\beta$ CD führte zu einem Anstieg der  $K_D$  auf 784, was somit deutlich zeigt, dass die Kluster Cholesterin-abhängig sind (Abb. 35 C). Auch der Vergleich der

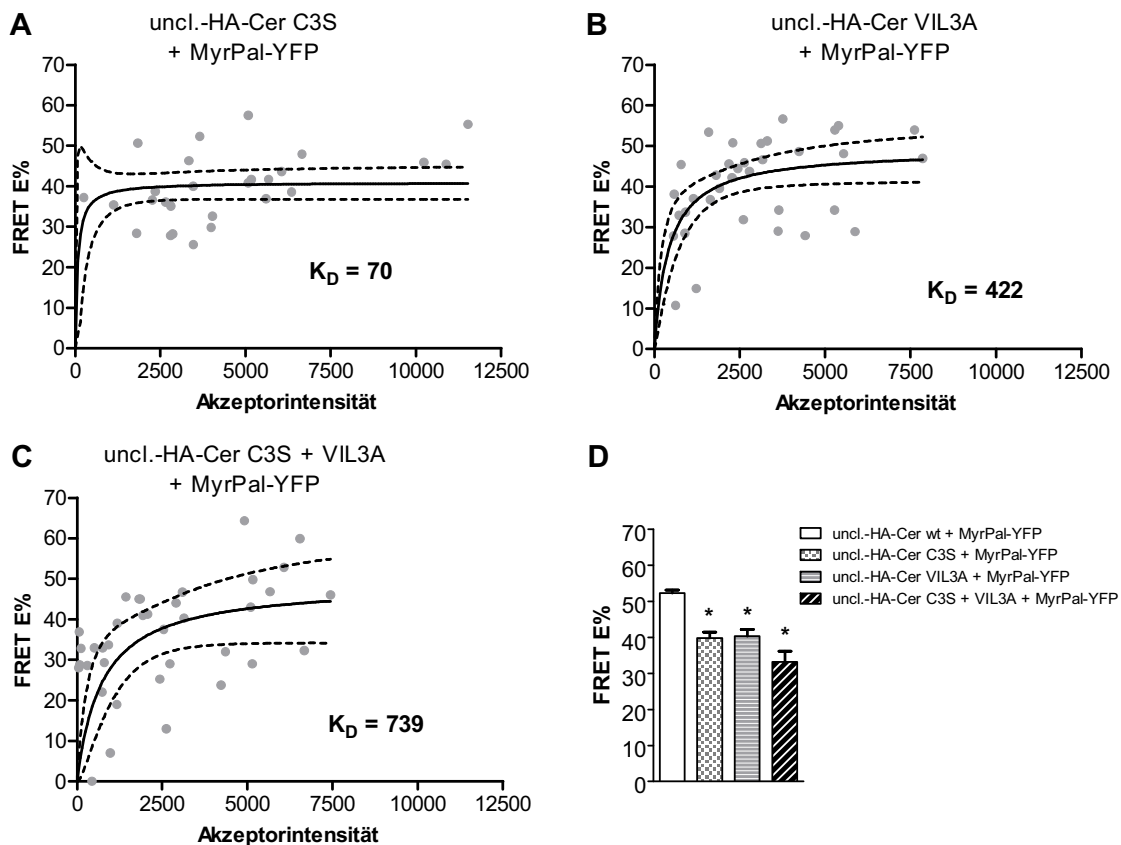
mittleren FRET-Effizienz von Zellen, denen Cholesterin entzogen wurde, mit unbehandelten Zellen zeigt, dass dieser Entzug in geringerem Energietransfer resultierte (Abb. 35 D). Diese Tatsache unterstützt die Theorie, dass HA sich in Cholesterin-abhängiger Weise in räumlicher Nähe zum Raft-Marker befindet, da ohne Cholesterin deutlich weniger Energietransfer stattfand. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass es sich bei den Klustern von HA-Cer und MyrPal-YFP um Rafts handelt und dass HA somit eine starke Raft-Affinität besitzt.

#### 5.4.3 Die HA-Lokalisation in Rafts ist abhängig von den DRM-Signalen des Proteins

Inwiefern die HA-Affinität zu Rafts von den intramolekularen DRM-Signalen abhängt, wurde anhand der Mutante der Transmembrandomäne (TMD), der Palmytylierungsmutante und der Doppelmutante untersucht. Hierfür wurde zuerst die Palmytylierungsmutante uncl.-HA-Cer C3S zusammen mit MyrPal-YFP exprimiert. E% verringerte sich hierbei signifikant im Vergleich zum Wildtyp auf 39,8% (Abb. 36 A). Die  $K_D$  stieg dabei auf 70 an (Abb. 36 B). Dies ist ein deutlicher Anstieg im Vergleich zum FRET-Paar uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP, jedoch ist der Wert verglichen mit der Akzeptorintensität immer noch relativ klein. Exprimiert man hingegen die TMD-Mutante uncl.-HA-Cer VIL3A gemeinsam mit MyrPal-YFP, führt das zu einem Anstieg der  $K_D$  auf 422 und zu einer Reduktion von E% auf 40,3% (Abb. 36 A, C). Der Effekt der beiden Raft-Signale besitzt demnach die gleiche Auswirkung auf die FRET-Effizienz, das Klustern von HA in den Rafts hängt aber etwas stärker von dem TMD-Signal als von der Palmytylierung ab. Die Untersuchung der Doppelmutante uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A ergab eine  $K_D$  von 739, und die FRET-Effizienz verringerte sich auf 33,3% (Abb. 36 A, D). Beide Signale haben demnach einen Einfluss auf die Raft-Integration von HA, der durch das gleichzeitige Entfernen beider Signale aus der HA-Sequenz noch verstärkt wird. Die Tatsache, dass die  $K_D$  der TMD-Mutante fast siebenmal höher war als diejenige der Palmytylierungsmutante, könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Transmembrandomäne eine wichtigere Rolle bei der Inkorporation von HA in Rafts spielt. Der Befund, dass selbst bei der Doppelmutante noch kein lineares Verhältnis zwischen E% und der Akzeptorintensität bestand könnte darauf hindeuten, dass HA-Cer und MyrPal-YFP unter anderem auch außerhalb von Rafts aufeinander treffen und dass die beiden Raft-Signale den Einbau von HA in Rafts nicht komplett verhindern. Auch Arbeiten an Detergens-resistenten Membranen haben zu Er-



gebnissen geführt, die weitere Raft-Signale im HA-Molekül nicht ausschließen (Chen et al., 2005).



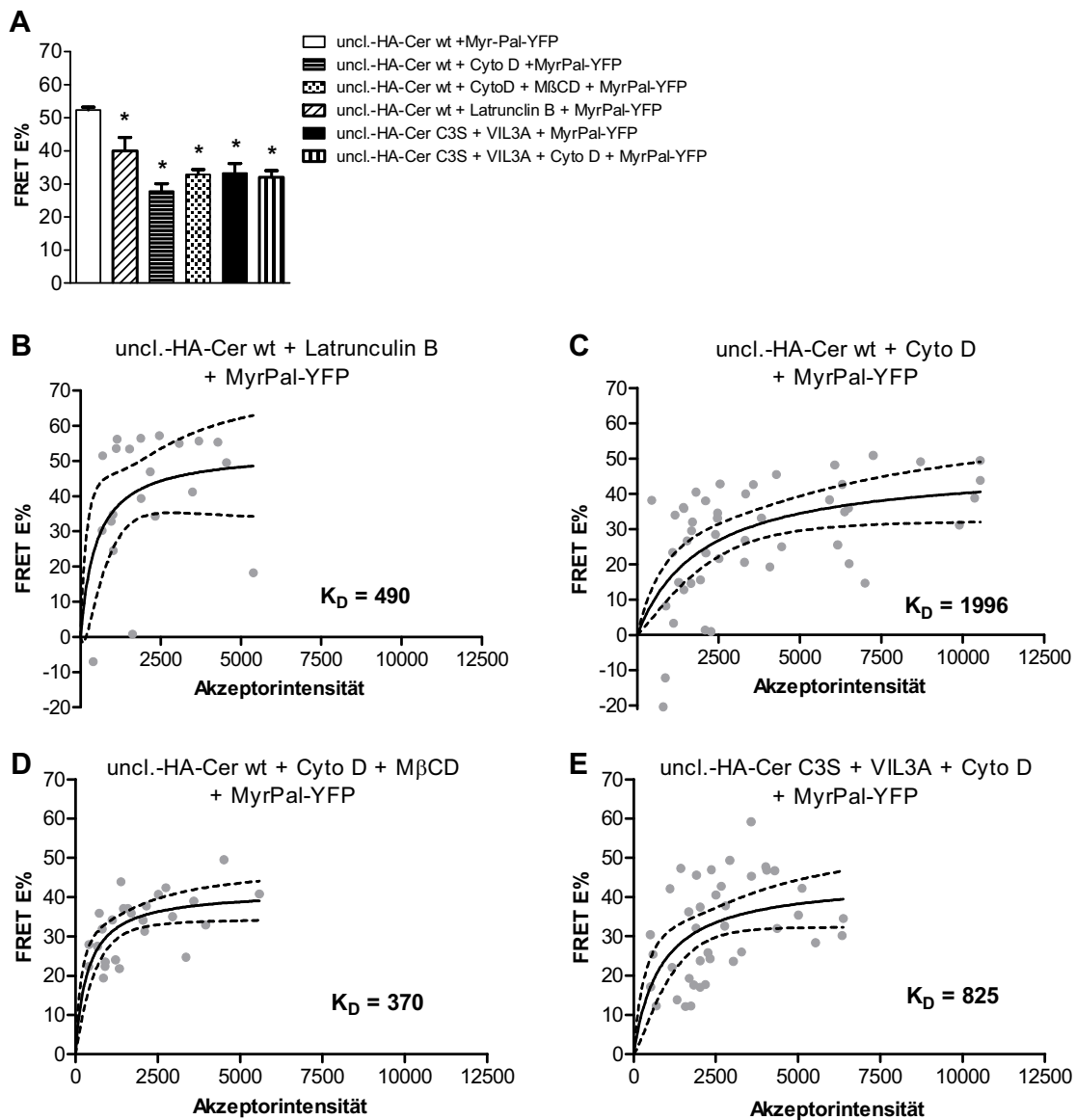
**Abbildung 36:** Die ersten Aminosäuren der Transmembrandomäne und die Palmitylierung von HA spielen eine wesentliche Rolle beim Einbau in Membran-Rafts. FLIM-FRET wurde wie in Abb. 34 beschrieben ausgewertet. **A:** Koexpression von uncl.-HA-Cer C3S und MyrPal-YFP;  $n: 27$ ,  $K_D: 70 \pm 90$ . **B:** Koexpression von uncl.-HA-Cer VIL3A und MyrPal-YFP;  $n: 35$ ,  $K_D: 422 \pm 181$ . **C:** Koexpression von uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A und MyrPal-YFP;  $n: 38$ ,  $K_D: 739 \pm 460$ . **D:** Mittelwert der FRET-Effizienz (E%) für die Experimente A–D. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* =  $P < 0,01$ , im Vergleich zu uncl.-HA-Cer wt + MyrPal-YFP, berechnet mit dem ungepaarten, einseitigen t-Test.

#### 5.4.4 Das Zytoskelett unterstützt den Einbau von HA in Rafts

Neben den intramolekularen Signalen und der Abhängigkeit der HA-Kluster von Cholesterin könnte aber auch das Zytoskelett eine wichtige Rolle für die Raft-Integrität von HA spielen. Es wurde beschrieben, dass das Zytoskelett ein Netzwerk aus Mikrofilamenten bildet, welches die Membran in Kompartimente aufteilt. Die laterale Diffusion der Membranproteine wird für einige Millisekunden auf ein solches Kompartiment beschränkt, bevor die Proteine in ein be-

nachbartes hüpfen (Kusumi et al., 2004). Demnach ist es möglich, dass sowohl der HA-Wildtyp als auch die Mutanten gemeinsam mit dem Raft-Marker in so einem Kompartiment vorkommen und somit auch Energietransfer stattfinden kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Zellen, die uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP exprimieren, mit Zytoskelett-Inhibitoren behandelt. Latrunculin B, welches in anderen Studien mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt worden war (Chichili und Rodgers, 2007), wirkte hier selbst bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und einer auf die Hälfte reduzierten Inkubationszeit sehr toxisch auf die Zellen (Abb. 14). Die ermittelte  $K_D$  lag bei 490 (Abb. 37 B) und die FRET-Effizienz war im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen um 12,3% gesunken (Abb. 37 A). Wurden die Zellen dagegen mit Cytochalasin D, einem weiteren Zytoskelett-Inhibitor (Cooper, 1987), behandelt, konnte kein toxischer Effekt auf die Zellen festgestellt werden. Diese Behandlung resultierte in der höchsten gemessenen  $K_D$  von 1996 (Abb. 37 C). Die mittlere FRET-Effizienz betrug nur 27,8% (Abb. 37 A).

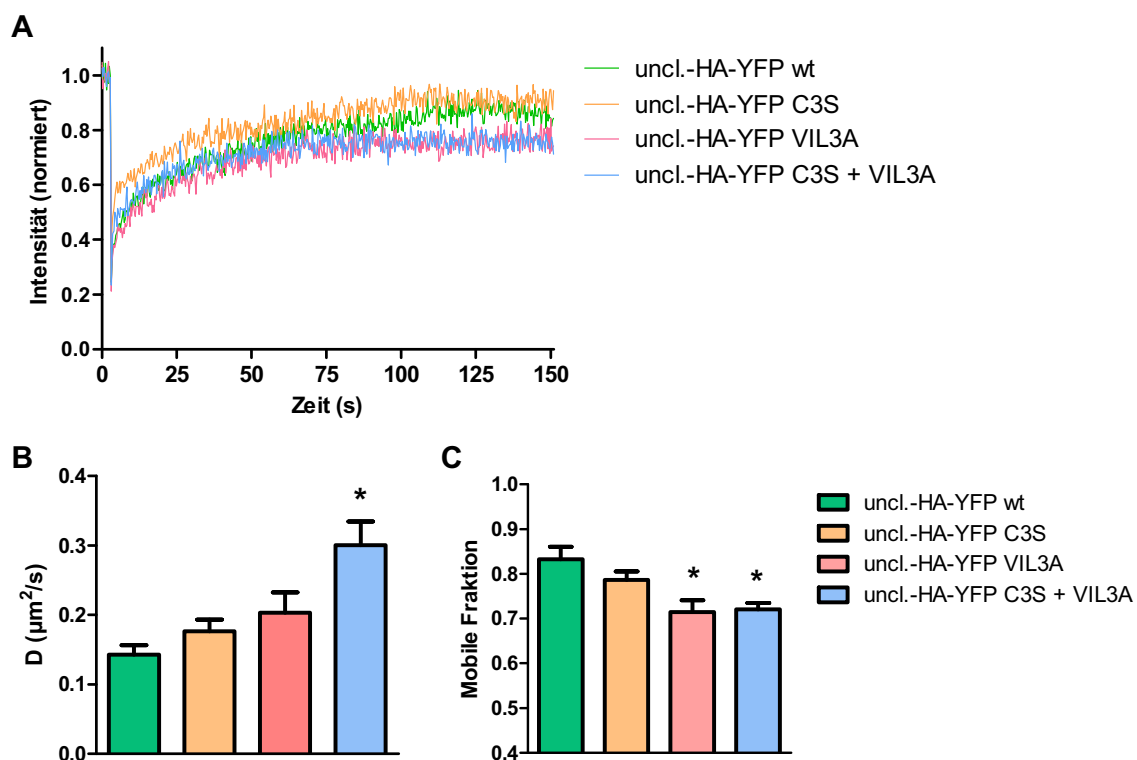
Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass die Kluster von HA mit dem Raft-Marker wesentlich vom Zytoskelett beeinflusst werden. Um herauszufinden, ob der Einfluss des Zytoskeletts unabhängig von den Rafts besteht, wurde untersucht, wie sich die Behandlung der Zellen mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin und Cytochalasin D auswirkt. Bei einem unabhängigen Effekt würden die beiden Inhibitoren synergistisch wirken. Die Behandlung der uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP exprimierenden CHO-Zellen mit Cytochalasin D und M $\beta$ CD führte zu einer  $K_D$  von 370 und einer mittleren FRET-Effizienz von 32,8% (Abb. 37 A, D). Somit scheint der Effekt des Zytoskeletts nicht unabhängig von den Rafts zu erfolgen. Dies sollte durch eine Behandlung von uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A und MyrPal-YFP exprimierenden Zellen mit Cytochalasin D bestätigt werden. Hierbei kam es zu keiner Veränderung von  $K_D$  und FRET E% im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen ( $K_D = 825$ , FRET E% = 32%) (vgl. Abb 35 A, D mit Abb. 37 A, E). Dieses Ergebnis widerlegt ebenfalls einen zusätzlichen Effekt des Zytoskeletts. Es scheint eher so, als würde das Zytoskelett die Raft-Kluster stabilisieren. Dabei ist es möglich, dass das Zytoskelett die Bildung der Rafts unterstützt oder auch den Zusammenschluss vieler kleiner Rafts zu einem Größeren fördert.



**Abbildung 37: Das Zytoskelett ist maßgeblich an den Klustern von HA mit dem Raft-Marker beteiligt.** FLIM-FRET wurde wie in Abb. 34 beschrieben ausgewertet. **A:** Mittelwert der FRET-Effizienz (E%) für die Experimente B–E. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* =  $P < 0,01$ , im Vergleich zu uncl.-HA-Cer wt + MyrPal-YFP, berechnet mit dem ungepaarten, einseitigen t-Test. **B–D:** Koexpression von uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP **B:** Behandlung der Zellen mit Latrunculin B; n: 21,  $K_D$ :  $490 \pm 432$ . **C:** Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Cytochalasin D, 20 h,  $37^\circ\text{C}$ ; n: 48,  $K_D$ :  $1996 \pm 923$ . **D:** Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Cytochalasin D, 20 h,  $37^\circ\text{C}$  und Behandlung mit 10 mM MβCD, 30 min, RT; n: 26,  $K_D$ :  $370 \pm 147$ . **E:** Koexpression von uncl.-HA-Cer C3S + VIL3A und MyrPal-YFP und Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Cytochalasin D, 20 h,  $37^\circ\text{C}$ ; n: 40,  $K_D$ :  $825 \pm 454$ .

## 5.5 Die laterale Diffusion in der Membran ist abhängig von der Lokalisation des Proteins

Anhand der Lokalisationsuntersuchungen von HA konnte gezeigt werden, dass HA eine starke Affinität zu Rafts besitzt und dass diese durch die Mutation der Raft-Signale abnimmt. Weiterhin scheint die Mutation der Transmembrandomäne einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit des intrazellulären Transports von HA zu besitzen. Da trotzdem ein korrekter Transport zur Plasmamembran stattfindet, sollte im Folgenden die Diffusionsgeschwindigkeit der unterschiedlichen HA-Mutanten untersucht sowie auch ein Vergleich mit dem Raft-



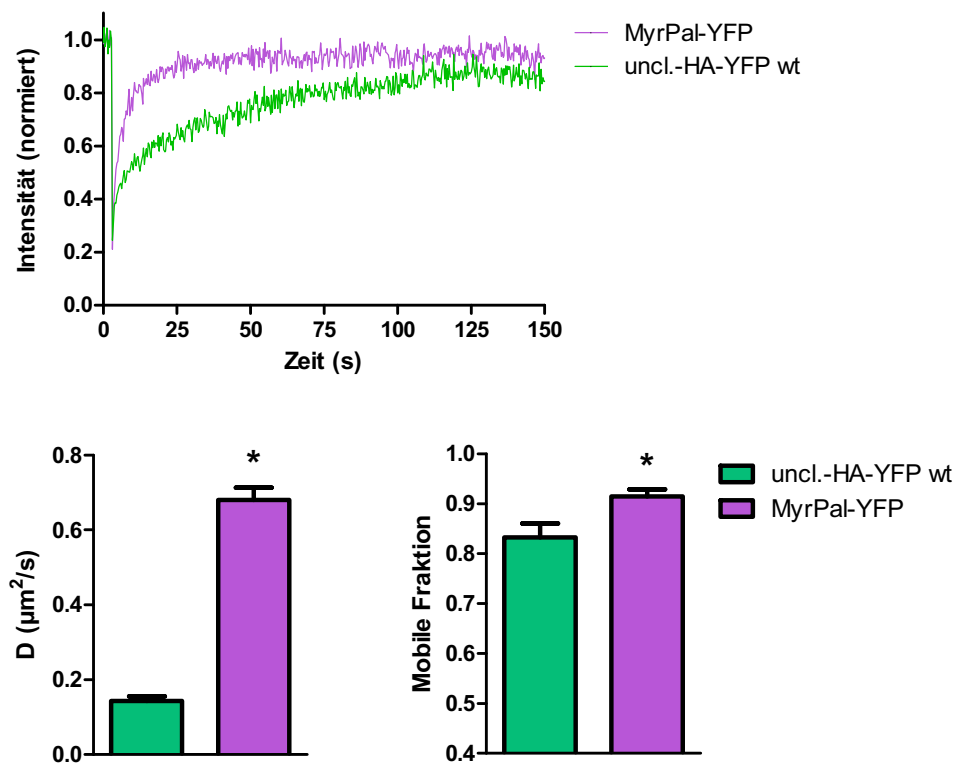
**Abbildung 38: Die HA-Mutanten diffundieren schneller als der Wildtyp.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-YFP wt/C3S/VIL3A bzw. C3S + VIL3A transfiziert und 24 h später die FRAP-Messung durchgeführt. Die Auswertung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **A:** Typische Rückdiffusionskurve der Konstrukte. Die Intensität wurde jeweils unter Berücksichtigung des Hintergrunds auf die vor dem Bleichen gemessene Intensität normiert. **B:** Mittlerer Diffusionskoeffizient ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ). **C:** Mittlere mobile Fraktion. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n \geq 30$  Zellen. \* =  $P < 0,05$  im Vergleich zu uncl.-HA-YFP wt, berechnet mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test.

Marker erstellt werden. Die FRAP-Experimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt, wobei die Bleicheinstellungen auf das jeweilige Konstrukt angepasst wurden, um jeweils einen Anteil gebleichter Proteine von 60 bis 70% zu erzielen. Gemessen

wurde die Rückdiffusion der YFP-Konstrukte in einer kreisförmigen Bleichregion der Plasmamembran auf der Oberseite der Zelle. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Region oberhalb des Nukleus befand, damit der Bereich unmittelbar unterhalb der Membran so wenig fluoreszierende Moleküle wie möglich enthielt. Es wurden auch für diese Experimente die ungespaltenen Formen von HA verwendet, um eine Beeinträchtigung durch die fusionsinaktive Form von HA auf den Diffusionskoeffizienten zu verhindern. Weiterhin wurden die jeweiligen YFP-Konstrukte eingesetzt, da YFP besser gebleicht werden kann als Cerulean. Es wurden von jedem Konstrukt jeweils mindestens 30 Zellen vermessen.

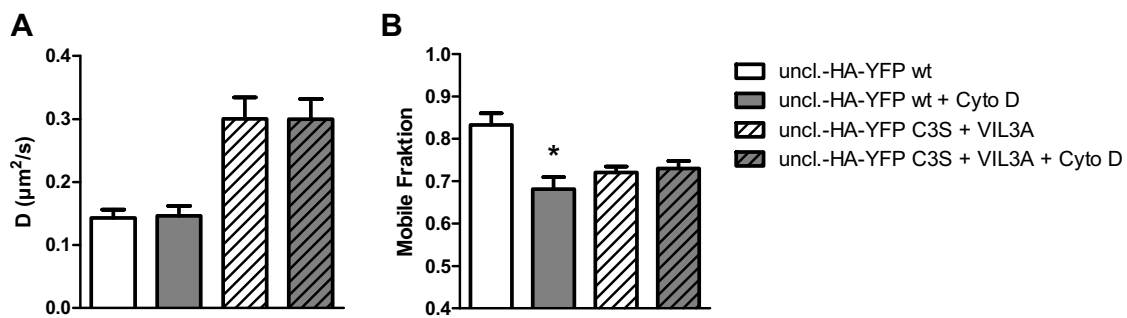
Der Vergleich des ungespaltenen Wildtyps mit den drei Mutanten C3S, VIL3A und C3S + VIL3A zeigt, dass die Mutationen eine Auswirkung auf die Diffusionsgeschwindigkeit haben (Abb. 38). Eine exemplarische Kurve der lateralen Diffusion der einzelnen HA-Konstrukte ist in Abbildung 38 A dargestellt. In Abbildung 38 B und C sind die aus den Kurven berechneten Mittelwerte des Diffusionskoeffizienten und der mobilen Fraktion vieler solcher Experimente zusammengefasst. Die Diffusionsgeschwindigkeit stieg von  $0,14 \mu\text{m}^2/\text{s}$  beim Wildtyp auf  $0,18$  bei der Palmitoylierungsmutante bzw. auf  $0,20$  bei der TMD-Mutante an. Die Doppelmutante diffundierte mit Abstand am schnellsten ( $0,30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) (Abb. 38 B). Demnach scheint die Geschwindigkeit gemeinsam mit der verringerten Raft-Affinität anzusteigen. Die mobile Fraktion verringerte sich hierbei stetig von 83% auf bis zu 72% bei der Doppelmutante (Abb. 38 C). Dies könnte daran liegen, dass HA, welches nicht mehr in Rafts eingelagert wird, instabiler ist und sich schneller zu weniger beweglichen Aggregaten zusammenlagert.

Anschließend wurde die laterale Diffusion von uncl.-HA-YFP wt mit der des Raft-Markers MyrPal-YFP verglichen. Hierbei zeigt schon die Rückdiffusionskurve (Abb. 39 A), dass MyrPal-YFP deutlich schneller diffundierte und darüber hinaus auch schneller ein Plateau erreichte. Der Diffusionskoeffizient ist 4,5fach höher als bei HA (Abb. 39 B). Die mobile Fraktion ist ebenfalls angestiegen auf 91,5% (Abb. 39 C). Beide Effekte sind wahrscheinlich auf die geringere Größe von MyrPal-YFP zurückzuführen, bzw. auf die Tatsache, dass HA ein transmembranäres Protein ist und MyrPal-YFP nur über zwei Acylierungen in der Membran verankert ist. Diese Ergebnisse passen sehr gut zu früheren Erkenntnissen, die gezeigt haben, dass HA ebenfalls 4,5mal langsamer diffundiert als das myristylierte und palmitylierte Protein Fyn-GFP (van't Hof und Resh, 1997), welches in jener Arbeit als Marker für Membran-Rafts auf der Innenseite der Membran verwendet wurde (Kenworthy et al., 2004).



**Abbildung 39: Der Raft-Marker diffundiert schneller als HA.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-YFP wt bzw. MyrPal-YFP transfiziert und 24 h später die FRAP-Messung durchgeführt. Die Auswertung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **A:** Typische Rückdiffusionskurve der Konstrukte. Die Intensität wurde jeweils unter Berücksichtigung des Hintergrunds auf die vor dem Bleichen gemessene Intensität normiert. **B:** Mittlerer Diffusionskoeffizient ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ). **C:** Mittlere mobile Fraktion. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n \geq 30$  Zellen. \* =  $P < 0,05$  im Vergleich zu uncl.-HA-YFP wt, berechnet mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test.

Da das Zytoskelett einen erheblichen Einfluss auf die Raft-Affinität der HA-Konstrukte besitzt, wurde dessen Auswirkung auf die laterale Diffusion untersucht. Hierfür wurden uncl.-HA-YFP wt bzw. uncl.-HA-YFP C3S + VIL3A exprimierende CHO-Zellen vor der FRAP-Messung mit Cytochalasin D behandelt. Diese Versuche zeigten, dass sich die Diffusionsgeschwindigkeiten des Wildtyps als auch der Doppelmutante durch die Behandlung mit Cytochalasin D nicht veränderten. Somit scheint die Zerstörung des Zytoskeletts im Zeitrahmen einer FRAP-Messung keinen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit von HA zu besitzen, weder bei der Raft-assoziierten noch bei der nicht-assoziierten Form (Abb. 40 A). Die mobile Fraktion der Doppelmutante wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Vergleicht man jedoch die mobilen Fraktionen des Wildtyps mit und ohne Cytochalasin-D-Behandlung, so zeigt sich eine deutliche Reduktion durch die Zerstörung des Zytoskeletts (Abb. 40 B).

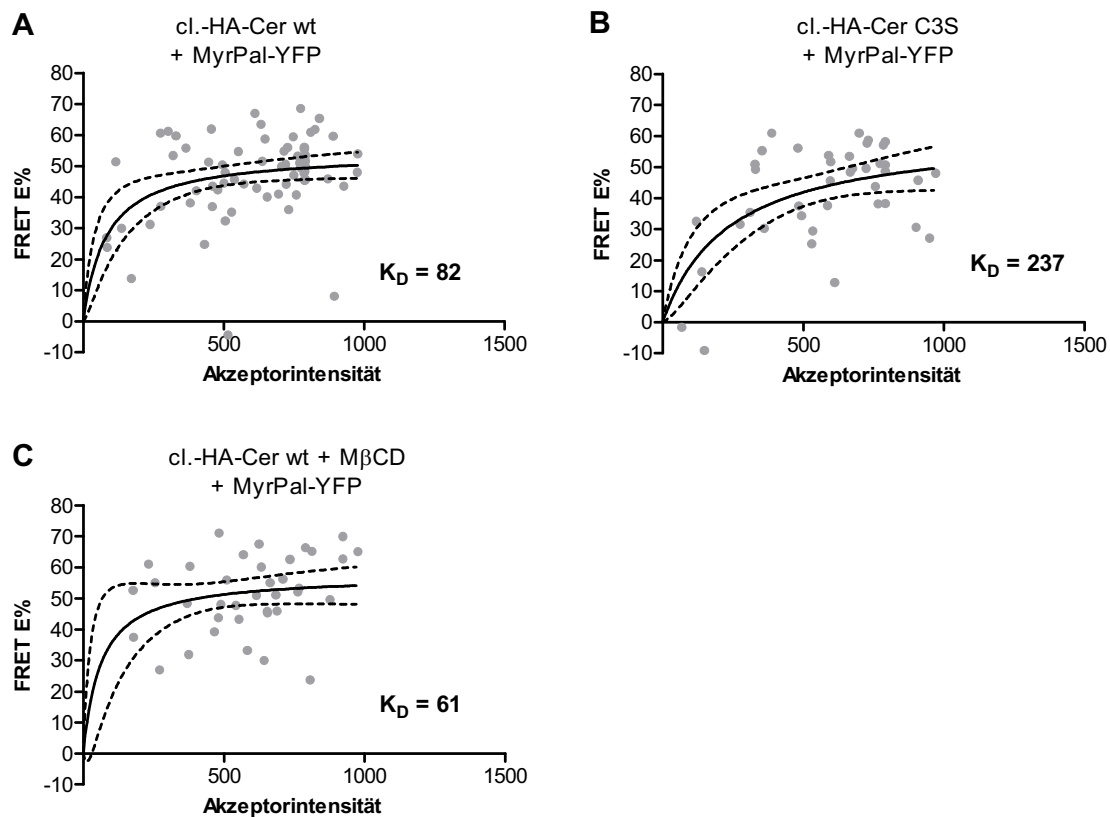


**Abbildung 40: Die Zerstörung des Zytoskeletts hat keinen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit von HA.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-YFP wt bzw. uncl.-HA-YFP C3S + VIL3A transfiziert. Die Zugabe von 1 µM Cytochalasin D erfolgte 20 h vor der FRAP-Messung. Die Auswertung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **A:** Mittlerer Diffusionskoeffizient (µm²/s). **B:** Mittlere mobile Fraktion. Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n ≥ 30 Zellen. \* = P < 0,05 im Vergleich zu uncl.-HA-YFP wt, berechnet mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test.

## 5.6 Die Membranfusion-katalysierende Konformationsänderung des HA verringert seine Raft-Affinität

### 5.6.1 Intrazellulär gespaltenes HA assoziiert weniger mit Rafts als ungespaltenes HA

Ohne die pH-neutralisierende Wirkung von M2 in der Zelle kann durch Furin gespaltenes HA eine Konformationsänderung erfahren. Hierbei liegt dann ein Großteil des an die Plasmamembran transportierten HAs in der pH-5-Konformation vor (Takeuchi und Lamb, 1994). Um zu untersuchen, ob sich dies auf den Einbau von HA in Rafts auswirkt, wurde cl.-HA-Cer wt zusammen mit MyrPal-YFP exprimiert und mit FLIM-FRET vermessen. Hieraus resultierte eine Anpassungskurve, die das Plateau deutlich später erreicht als bei dem ungespaltenen HA (vergleiche Abb. 35 A und Abb. 41 A). Auch der  $K_D$ -Wert liegt mit 82 deutlich höher (Abb. 41 A). Zudem ist der Unterschied zwischen dem intrazellulär gespaltenen Wildtyp und der dazugehörigen Palmylierungsmutante sehr gering ( $K_D$  82 zu 237) (Abb. 41 B). Und auch der Entzug von Cholesterin führt hierbei zu keinem weiteren Anstieg des  $K_D$ -Wertes im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Abb. 41 C). Daraus lässt sich schließen, dass der Energietransfer von cl.-HA-Cer wt auf den Raft-Marker eher durch zufälliges Zusammentreffen stattfindet und nicht auf einer Inkorporation von HA in Rafts beruht.



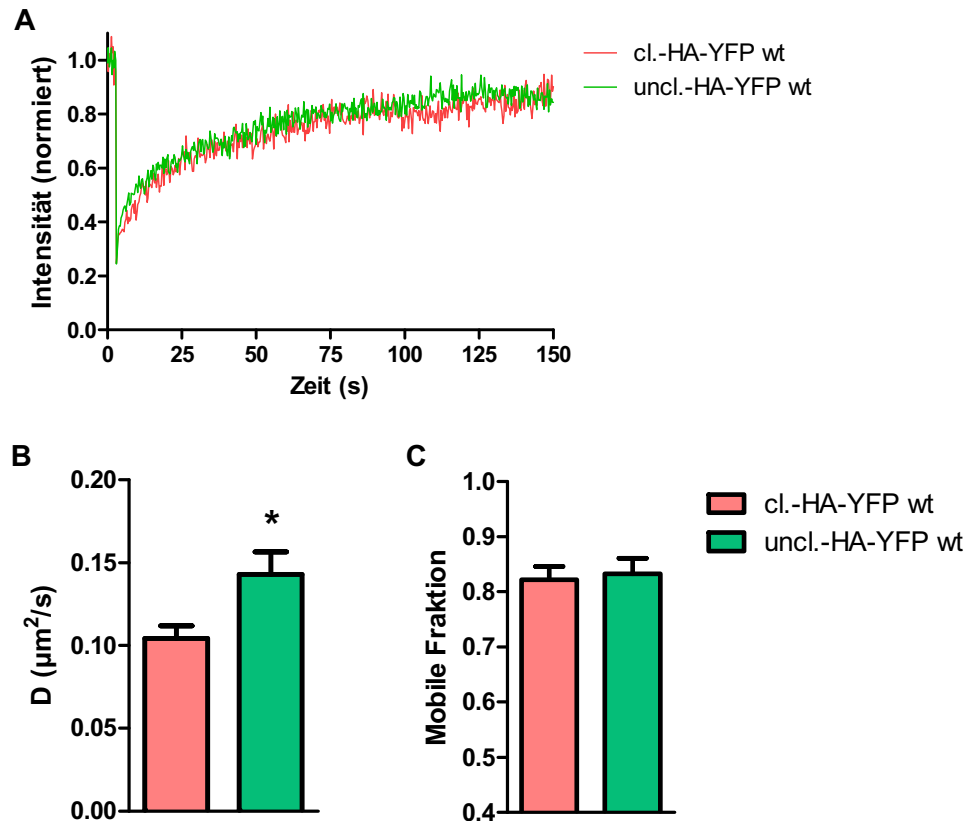
**Abbildung 41: cl.-HA-Cer wt klustert deutlich weniger mit dem Raft-Marker als uncl.-HA-Cer wt.** FLIM-FRET wurde wie in Abb. 34 beschrieben ausgewertet. **A:** Koexpression von cl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP; n: 68,  $K_D$ :  $82 \pm 41$ . **B:** Koexpression von cl.-HA-Cer C3S und MyrPal-YFP; n: 40,  $K_D$ :  $237 \pm 136$ . **C:** Koexpression von cl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP + 10 mM M $\beta$ CD, 30 min, 37 °C; n: 37,  $K_D$ :  $61 \pm 53$ .

### 5.6.2 Gespaltenes HA bildet keine unbeweglichen Aggregate in der Zellmembran

Die geringe Affinität von gespaltenem HA zu Rafts könnte darüber hinaus auch auf der Bildung unbeweglicher Aggregate, die durch die Konformationsänderung entstanden sind, beruhen. Dadurch wäre HA dann nur aus sterischen Gründen nicht in Rafts. Zur Klärung dieser Frage wurden FRAP-Messungen durchgeführt, um die mobile Fraktion von cl.-HA-YFP wt mit uncl.-HA-YFP wt zu vergleichen. Dieser Vergleich ergab, dass die mobile Fraktion in beiden Fällen gleich ist (82% bzw. 83%) (Abb. 42 B). Der Diffusionskoeffizient ist beim gespaltenen HA um  $0,04 \mu\text{m}^2/\text{s}$  kleiner (Abb. 42 A). Ein Grund dafür könnte sein, dass sich das



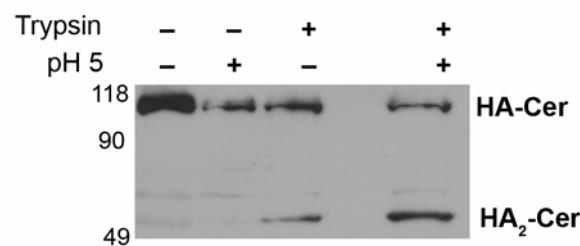
Fusionspeptid nach der Konformationsänderung ebenfalls in der Nähe der Membran befindet und dann durch die erhöhte Anzahl von Proteindomänen eine Verlangsamung der Moleküle eintritt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Anzahl der in die Membran inserierten Domänen ein wichtiger Faktor für den Diffusionskoeffizienten von Transmembranproteinen ist (Lippincott-Schwartz et al., 2001).



**Abbildung 42: Die intrazelluläre Spaltung von HA hat keinen Einfluss auf die Mobilität.** FRAP wurde an CHO-Zellen, die entweder cl.-HA-YFP wt oder uncl.-HA-YFP wt exprimierten, gemessen. Die Auswertung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **A:** Typische Rückdiffusionskurve der Konstrukte. Die Intensität wurde jeweils unter Berücksichtigung des Hintergrunds auf die vor dem Bleichen gemessene Intensität normiert. **B:** Mittlerer Diffusionskoeffizient ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ). **C:** Die mittlere mobile Fraktion beider HA-Formen ist gleich. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n \geq 30$  Zellen. \* =  $P < 0,05$  im Vergleich zu cl.-HA-YFP wt, berechnet mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test.

### 5.6.3 Furin- und Trypsin-gespaltenes HA haben die gleiche Raft-Affinität

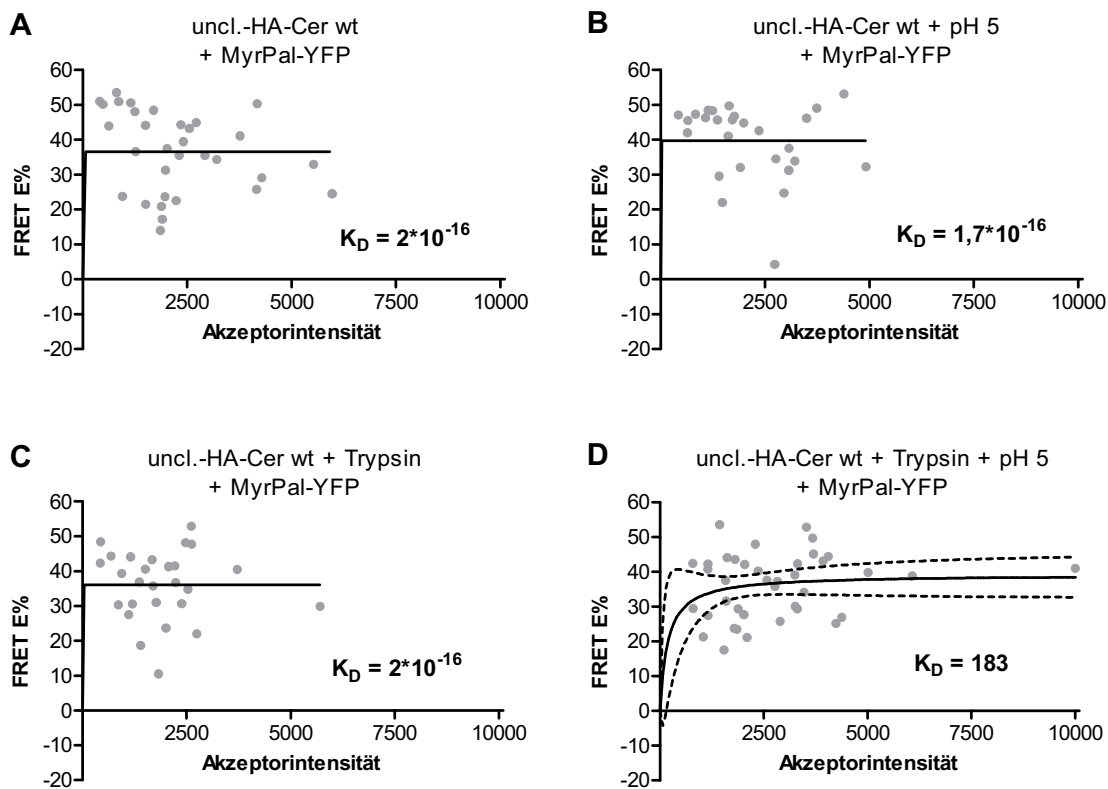
Nachdem gezeigt werden konnte, dass keine unbeweglichen Aggregate für den geringen Einbau von gespaltenem HA in Rafts verantwortlich sind, sollte der Einfluss der Konformationsänderung zur pH-5-Konformation an ungespaltenem HA untersucht werden. Dafür wurde uncl.-HA-Cer wt extrazellulär mit Trypsin gespalten und anschließend zur Auslösung der Konformationsänderung mit pH 5 behandelt. Zur Kontrolle, ob diese extrazelluläre Spaltung funktioniert hat, wurden vier CHO-Zellansätze mit uncl.-HA-Cer wt transfiziert und anschließend entweder nicht behandelt oder mit pH 5, mit Trypsin bzw. mit Trypsin und pH 5 behandelt (siehe Material und Methoden). Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot und Immundetektion sichtbar gemacht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 5 µg/ml Trypsin ausreichend sind, um HA in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer zu spalten (Abb. 43). Hierbei war nur die Detektion von HA<sub>2</sub>-Cer möglich, da HA<sub>1</sub> mit dem anti-GFP-Antikörper nicht detektiert werden kann. Die Behandlung mit pH 5 allein hatte hingegen keine Auswirkung auf das ungespaltene HA (Abb. 43). Das trotz der Trypsin-Behandlung noch ungespaltenes HA vorhanden ist, liegt vermutlich daran, dass es sich hier um HA handelt, welches noch intrazellulär prozessiert wurde und somit für Trypsin nicht zugänglich war.



**Abbildung 43: Trypsin spaltet uncl.-HA-Cer wt extrazellulär.** CHO-Zellen wurden mit uncl.-HA-Cer wt transfiziert. Die Behandlung erfolgte 24 h nach der Transfektion mit 5 µg/ml Trypsin für 5 min bei RT und/oder Fusionspuffer pH 5 für 3 min bei 37 °C. Das Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und HA mit anti-GFP-Antikörper detektiert. HA-Cer = ungespaltenes HA, HA<sub>2</sub>-Cer = HA-Untereinheit nach der Spaltung, HA<sub>1</sub> ist mit dem anti-GFP-Antikörper nicht detektierbar. Links ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

Da das ungespaltene fluoreszenzmarkierte HA demnach extrazellulär durch Trypsin gespalten werden kann, wurden FLIM-FRET-Experimente durchgeführt, um den Effekt der extrazellulären Spaltung auf die Raft-Assoziation zu untersuchen. Hierbei wurden an mehreren Messstagen jeweils die vier Ansätze (unbehandelt, pH 5, Trypsin, Trypsin + pH 5) untersucht. Hierbei

konnte die starke Raft-Integration von uncl.-HA-Cer wt, wie auch schon oben beschrieben, bestätigt werden (Abb. 44 A). Die Behandlung mit pH 5 bzw. Trypsin hatte hierauf keinen Einfluss (Abb. 44 B, C). Wurden die Zellen allerdings vor der Messung zuerst mit Trypsin und dann mit pH 5 behandelt, stieg der  $K_D$ -Wert auf 183 an (Abb. 44 D). Dieser Wert ähnelt dem Wert von cl.-HA-Cer wt (Abb. 41 A). Demnach führen die Spaltung und die anschließende Konformationsänderung zur pH-5-Konformation von HA zu einer geringeren Raft-Affinität im Vergleich zu ungespaltenem HA in der pH-7-Konformation.



**Abbildung 44: Die durch Trypsin und pH-5-Behandlung induzierte Konformationsänderung von HA führt zu einer vergleichbaren Raft-Lokalisation wie bei intrazellulär gespaltenem HA.** FLIM-FRET wurde wie in Abb. 34 beschrieben ausgewertet. **A-D:** Koexpression von uncl.-HA-Cer wt und MyrPal-YFP **A:** unbehandelt; n: 32,  $K_D: 2 \times 10^{-16}$ . **B:** Inkubation mit Fusionspuffer pH 5, 3 min bei 37 °C; n: 27,  $K_D: 1,7 \times 10^{-16}$ . **C:** Behandlung mit 5 µg/ml Trypsin, 5 min bei RT; n: 27,  $K_D: 2 \times 10^{-16}$ . **D:** Behandlung mit Trypsin und anschließend Inkubation mit Fusionspuffer; n: 39,  $K_D: 183 \pm 194$ .

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Raft-Affinität von HA zum ersten Mal mittels der FLIM-FRET-Methode in lebenden Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HA mit dem etablierten Raft-Marker MyrPal-YFP Kluster bildet und demnach mit Membran-Rafts assoziiert ist. Hierbei hat sich herausgestellt, dass HA in einer Cholesterin- und Zytoskelett-abhängigen Weise mit den Rafts assoziiert und dass dabei sowohl die Transmembrandomäne als auch die Palmitoylierung von HA eine wichtige Rolle spielen. Die Untersuchung ergab außerdem, dass HA nach Auslösen der Konformationsänderung zur pH-5-Konformation eine verringerte Raft-Affinität aufweist, was darauf hindeutet, dass HA nach der Fusion in Nicht-Raft-Domänen lokalisiert ist.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde HA mit Cerulean, einer verbesserten Variante des cyan-fluoreszierenden Proteins (CFP), bzw. mit YFP markiert. Hierbei war besonders die Wahl des Linkers, des Verbindungsglieds zwischen HA und Cerulean, entscheidend. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Linker getestet, und nur mit dem Linker LRPEAPRRARDPPVAT konnte HA korrekt prozessiert und an die Plasmamembran transportiert werden (Abb. 22, 23). Auch frühere Studien haben gezeigt, dass die Verlängerung des C-Terminus um wenige Aminosäuren den Transport von HA an die Plasmamembran bereits unmöglich machen kann (Doyle et al., 1985). Ein Grund dafür ist womöglich, dass die korrekte Faltung des Proteins durch das Anfügen weiterer Aminosäuren gestört wird. Dadurch, dass diese Proteine nicht zur Plasmamembran transportiert werden, wird verhindert, dass falsches oder unvollständiges HA in die neuen Virionen eingebaut wird (Gething et al., 1986). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Transport des fluoreszenzmarkierten HAs sorgfältig überprüft, und es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Prozessierung der Kohlenhydratseitenketten als auch die Spaltung von HA in die Untereinheiten und der Transport zur Plasmamembran korrekt ablaufen (Abb. 25, 26). Weiterführende Studien von Christian Sieben (Molekulare Biophysik, HU Berlin) konnten darüber hinaus belegen, dass auch das fluoreszenzmarkierte HA noch eine Fusionsreaktion, und zwar einen Austausch von Lipiden zwischen R18-fluoreszenzmarkierten Erythrozyten und der Plasmamembran von HA-exprimierenden Zellen, auslösen kann (persönliche Korrespondenz mit C. Sieben). Die Untersuchungen bezüglich des Transports, der korrekten Prozessierung und der Funktion als Fusions-vermittelndes Protein zeigen, dass sich HA-Cerulean in der Zelle genauso verhält wie

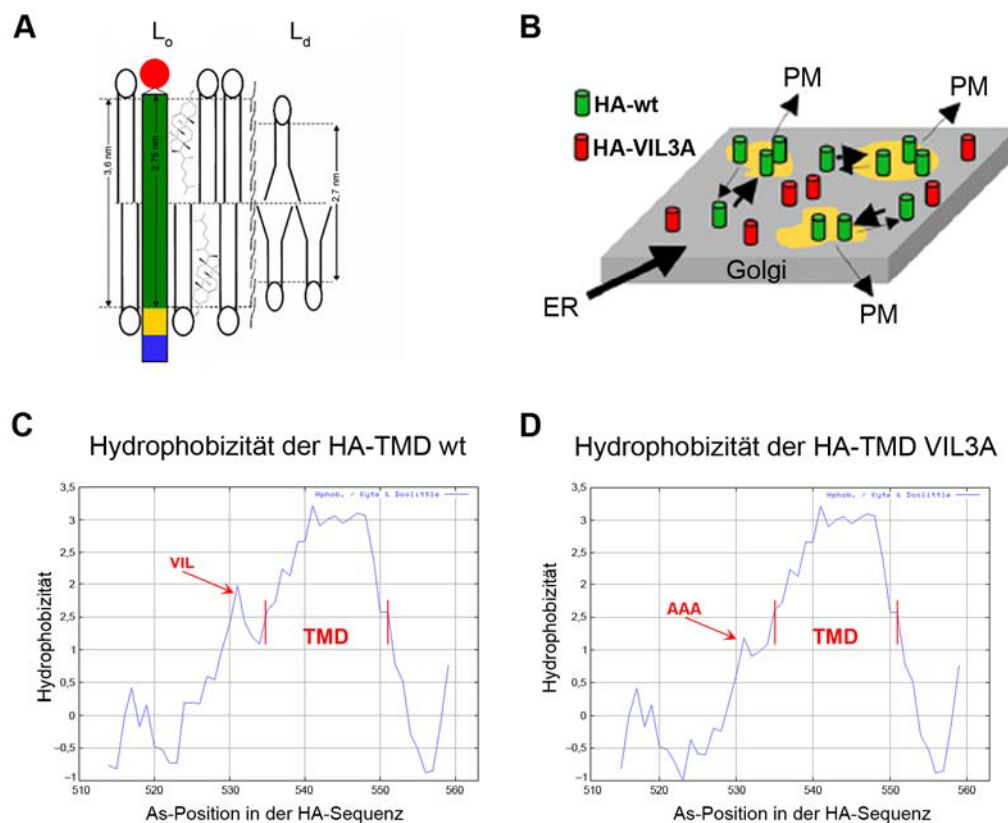
nicht-markiertes HA, und man kann somit davon ausgehen, dass es auch dieselbe Raft-Affinität besitzt.

### **6.1 Der Transport von HA zur Plasmamembran wird durch den Austausch der ersten Aminosäuren der Transmembranregion verzögert**

Die Untersuchungen der einzelnen Stufen des Transports von HA und von dessen Mutanten entlang des exozytischen Weges zeigen, dass dieser durch den Austausch der ersten drei Aminosäuren des äußeren Teils der Transmembrandomäne beeinflusst wird. Allerdings verhindert die Mutation nicht die korrekte Prozessierung des Proteins, sondern führt nur zu einer Verzögerung dieser Prozesse (Abb. 30, 31). Durch diese Experimente wurde aber ebenfalls deutlich, dass, wie auch schon in früheren Arbeiten gezeigt, die Mutation der Palmitoylierungsstellen keine Auswirkung auf den Transport des HAs hat (Steinhauer und Skehel, 2002; Wagner et al., 2005; Zhang et al., 2000).

Anhand der Experimente zur Trimerisierung des Proteins konnte gezeigt werden, dass die Faltung und Oligomerisierung im ER noch unbeeinflusst von der veränderten Transmembrandomäne erfolgen (Abb. 32). Die Halbwertszeit für die Erlangung der Endo-H-Resistenz sowie für die Spaltung von HA in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>-Cer, ist bei der TMD-Mutante allerdings jeweils ungefähr doppelt so lang wie beim Wildtyp-HA (Abb. 30, 31).

Wodurch wird diese Verzögerung des Transports der TMD-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-HA ausgelöst? Zwei Mechanismen können den Transport eines Proteins in den Golgi im Allgemeinen verhindern: Die Faltung des Proteins ist gestört und es verbleibt somit im ER, oder das Protein wird nicht in die Transportvesikel eingebaut die es zum Golgi transportieren. Die hier gewonnenen Resultate zeigen, dass alle Proteine gleich schnell trimerisiert werden (Abb. 32) und somit ist höchstwahrscheinlich der vesikuläre Transport für diese Verzögerung verantwortlich.



**Abbildung 45: Die Länge der TMD ist wichtig für den Einbau eines Proteins in Membran-Rafts.** **A:** Röntgenstrukturmessungen haben gezeigt, dass der Abstand der Kopfgruppen in „liquid-ordered“ ( $L_o$ ) Domänen 4,7 nm beträgt und bei nichtgeordneten Bereichen der Membran ( $L_d$ ) nur 3,8 nm. Nach (Gandhavadi et al., 2002). **B:** Nur die Proteine, die sich in den Transportdomänen (gelb) befinden werden zur Plasmamembran (PM) transportiert. Die grünen Zylinder symbolisieren das Wildtyp-HA (HA-wt), welches vermehrt in den Transportdomänen vorkommt. Die roten Zylinder symbolisieren die TMD-Mutante (HA-VIL3A), und diese verbleibt aufgrund der verkürzten TMD länger in den Prozessierungsdomänen (grau). Nach (Patterson et al., 2008). **C und D:** Kyte-Doolittle-Blot von 45 Aminosäuren (As) der HA-Sequenz des hier verwendeten Subtyps H7. Je höher der Wert auf der y-Achse, desto hydrophober ist eine Aminosäure. Erstellt mit [www.expasy.org](http://www.expasy.org). **C:** Die Sequenz des Wildtyps (VIL). **D:** Die Sequenz der TMD-Mutante (AAA); TMD markiert den Bereich der Transmembrandomäne.

Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen wurde in früheren Arbeiten der Abstand der Kopfgruppen der inneren und äußeren Lipidschicht einer artifiziellen Membran, bestehend aus einer Mischung von DOPC (1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin), Sphingomyelin und Cholesterin im Verhältnis 1:1:1, untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass der Abstand in den geordneten Domänen ( $L_o$ ) 4,7 nm beträgt und in den nicht geordneten Bereichen ( $L_d$ ) nur 3,8 nm (Abb. 45 A) (Gandhavadi et al., 2002). Dies liegt vor allem daran, dass die Lipide, die vornehmlich in Membran-Rafts eingebaut werden, schon aufgrund ihrer eigenen Struktur länger sind. Auch in vivo wurde die Dicke der Membran gemessen und gezeigt, dass die Memb-

ran des ERs dünner ist als die des Golgis und diese wiederum dünner als die apikale Membran in polar wachsenden Zellen (Mitra et al., 2004). Ein Grund dafür könnte sein, dass sich Membran-Rafts im Golgi bilden und als Transportdomänen für den apikalen Transport fungieren (Ikonen, 2001; Keller und Simons, 1998; Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001). Auch der Vergleich verschiedener Proteine hat gezeigt, dass jene, die im ER bleiben eine deutlich kürzere TMD besitzen als Proteine, die zur Plasmamembran transportiert werden (Munro, 1998; Ronchi et al., 2008). Patterson et al. haben aufgrund ihrer Ergebnisse, dass die Membrandicke vom ER bis zur Plasmamembran kontinuierlich zunimmt und darüber hinaus, dass die Transmembrandomäne an der Integration eines Proteins in bestimmte Zisternen des Golgis beteiligt ist, folgende Hypothese entwickelt (Patterson et al., 2008): Die Golgi-Zisternen sind aus zwei Domänen aufgebaut: die Prozessierungsdomänen (grau) und die Exportdomänen (gelb), und nur über die Exportdomänen findet ein Transport in die nächste Zisterne bzw. an die Plasmamembran statt. Dabei enthalten diese Domänen einen höheren Anteil an Sphingolipiden als die Prozessierungsdomänen und sind insgesamt dicker. Proteine, die eine längere Transmembrandomäne besitzen werden dabei bevorzugt in Exportdomänen integriert und die Proteine mit einer kürzeren TMD befinden sich vornehmlich in den Prozessierungsdomänen (Abb. 45 B) (Patterson et al., 2008).

Dieses Modell bietet eine mögliche Erklärung für den verzögerten Transport der TMD-Mutante (Abb. 45 B). Vergleicht man die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin (VIL) mit Alanin, so wird deutlich, dass es sich bei Valin, Isoleucin und Leucin um große, unpolare und hydrophobe Aminosäuren handelt und dass Alanin eine eher kleine und weniger hydrophobe Aminosäure ist. Die Analyse der Aminosäuren 515 bis 558 von HA-wt bzw. HA-VIL3A mit Hilfe des Kyte-Doolittle-Blots zeigt dabei, dass dieser Aminosäurenaustausch dazu führt, dass ein von VIL erzeugter „hydrophobe Haken“ kurz vor der TMD verschwindet. Die eigentliche Transmembrandomäne beginnt in diesem Blot erst zwei Aminosäuren später (Abb. 45 C, D). Dieser „hydrophobe Haken“ könnte dabei auch als Verlängerung der TMD angesehen werden, die es dem Protein ermöglicht in dickere Membranen eingebaut zu werden. Ein Vergleich der Transmembrandomänen verschiedener HA-Subtypen zeigt, dass die Aminosäuren Isoleucin und Leucin hochkonserviert sind und deshalb wahrscheinlich wichtig für die Integration von HA in die Membran (Tab. 2). Wendet man diese Beobachtungen auf das Modell von Patterson an, so ist es möglich, dass die TMD-Mutante aufgrund ihrer kürzeren Transmembrandomäne länger in den Prozessierungsdomänen verbleibt als der Wildtyp (Abb. 45 B), und dies führt dazu, dass der Transport von Zisterne zu Zisterne verzögert wird.

**Tabelle 2: Sequenz der Transmembrandomänen verschiedener HA-Subtypen**

Antigen- formel	Nomenklatur	Sequenz der Transmembrandomäne (524–563)
H1N2	A/Sw/Mn/16419/01	GIYQ <b>IL</b> AIYSTVASSLVLVVSLGAISF <b>W</b> MCSNGSLQCRICM
H2N2	A/Singapore/1/57	GVYQ <b>IL</b> AIYATVAGSLSLAIMMAGISF <b>W</b> MCSNGSLQCRICI
H3N2	A/Hong Kong/1/68	YKD <b>WILW</b> ISFAISCFLLCVVLLGFIM <b>W</b> ACQRGNIRCNICI
H5N1	A/Chicken/Scotland/59	GVYQ <b>IL</b> SIYSTVASSLALAIMIAGLSF <b>W</b> MCSNGSLQCRICI
H6N1	A/Duck/Hong Kong/73/76	GVYQ <b>IL</b> AIYSTVSSSLVLVGLIMAMGL <b>W</b> MCSNGSMQCRICI
<b>H7N1</b>	<b>A/FPV/Rostock/34</b>	YKD <b>VILW</b> ESFGASCFLLLAIAMGLVFICVKNGNMRCTICI
H8N4	A/Turkey/Ontario/6118/68	TTYK <b>IL</b> SIYSTVAASLCLAILIAGGLILGMQNGSCRCMFCI
H9N2	A/Turkey/Wisconsin/66	GT <b>YKIL</b> TIYSTVASSLVLAMGF <b>AAFLF</b> WAMSNGSCRCNICI
H10N7	A/Avian/Germany/1949	YKDI <b>ILW</b> ESFGESCFVLLAVVMGLVFFCLKNGNMRCTICI
H11N6	A/Duck/England/56	NVYK <b>IL</b> SIYSCIASSLVLAALIMGF <b>MF</b> WACSNNGSCRCCTICI
H15N8	A/Duck/Australia/341/83	YKD <b>VILW</b> ESFGASCVMLLAIAMGLIFMCVKNGNLRCTICI

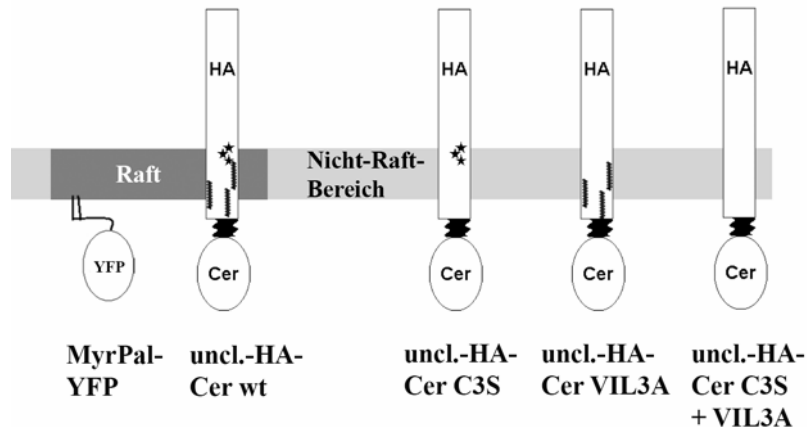
Der Vergleich der TMDs verschiedener HA-Subtypen macht deutlich, dass die Aminosäuren Isoleucin (L) und Leucin (I) hochkonserviert sind und es nur einen weiteren Subtyp gibt der auch Valin (V) enthält (rot). Die eigentliche TMD fängt allerdings erst zwei Aminosäuren später an (unterstrichen). Die aromatischen, polaren Aminosäuren Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) sind fett dargestellt. Diese sind hydrophil und liegen wahrscheinlich im Bereich der polaren Kopfgruppen der Lipide der Membran.

Ein weiterer Hinweis, dass VIL wichtig ist für den Einbau in Membran-Rafts ergibt sich, wenn man nochmals die TMDs der HA-Subtypen betrachtet (Tab. 2). Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) befinden sich nicht nur am Anfang und Ende der TMD, sondern auch noch vor der VIL-Sequenz. Diese Aminosäuren werden wahrscheinlich aufgrund ihrer Polarität in den Bereich der polaren Kopfgruppen der Membranlipide eingelagert und bilden somit den Abschluss der sehr langen Transmembrandomäne (Andersen und Koeppe, 2007). Diese überdurchschnittliche Länge begünstigt eventuell einen raschen Einbau von HA in die Exportdomänen. Für das Virus wäre dies von Vorteil, da durch diesen raschen Transport eine schnelle Virusvermehrung möglich wäre.



## 6.2 Die HA-Mutanten haben eine Auswirkung auf die Raft-Affinität von HA (zu FLIM-FRET)

Das Ziel dieser Arbeit war, die Eigenschaften der Raft-Lokalisation von HA in lebenden Zellen nachzuweisen. FLIM-FRET ist eine gute Methode für den Nachweis von Rafts in lebenden Zellen (Mayor und Rao, 2004), wie auch mit den hier durchgeführten Kontrollexperimenten, die der Evaluierung der Methode dienten, bestätigt werden konnte (Abb. 34). Als etablierter Raft-Marker und Akzeptor für diese Versuche wurde MyrPal-YFP verwendet (Abb. 20). Die Untersuchungen gemeinsam mit dem ungespaltenen HA in der pH-7-Konformation führten dabei zu dem Ergebnis, dass HA in gemeinsamen Klustern mit MyrPal-YFP zugegen ist (Abb. 35). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass diese Klusterbildung teilweise von den intramolekularen HA-Signalen abhängt, die für die Detergensunlöslichkeit des Proteins in Triton-Extraktionsexperimenten mitverantwortlich sind, die Palmitylierung und die hydrophoben Aminosäuren zu Beginn der Transmembranregion (Abb. 36, 46). Anhand von Cholesterin-Depletions-Experimenten wurde dann ein weiterer Hinweis geliefert, dass es sich bei diesen Klustern um Rafts handelt (Abb. 35).



**Abbildung 46: Wildtyp-HA hat eine stärkere Raft-Affinität als die HA-Mutanten.** Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Deletion der bekannten DRM-Signale auch zu einer Reduktion der Affinität der HA-Konstrukte zu Membran-Rafts führt. Hierbei hat die Mutation der Transmembranregion einen stärkeren Effekt als die Mutation der Palmitylierungsstellen. Beide Signale wirken dabei leicht synergistisch.

Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen dabei darauf schließen, dass die Transmembranregion einen etwas größeren Einfluss auf den zielgerichteten Transport von HA besitzt und weiterhin, dass die beiden Signale teilweise synergistisch wirken (Abb. 36). Schon früher wurde der TMD, aufgrund der Resultate von Triton-Extraktionsexperimenten, ein höherer Stellenwert im

Hinblick auf die Funktion als DRM-Signal beigemessen (Chen et al., 2005). Weitere Studien mit einer ähnlichen TMD-Mutante zeigten, dass diese komplett aus den DRMs ausgeschlossen wird (Takeda et al., 2003). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die hier verwendete Methode deutlich sensibler ist, da die Mutation nur zu einer Reduktion der Affinität von HA zu Rafts führte. Es könnte allerdings auch bedeuten, dass die DRMs Membran-Rafts zwar ähnlich, jedoch kein genaues Abbild dieser sind. Darüber hinaus führt hier die Mutation beider Signale in demselben Konstrukt nicht zu einem vollständigen Ausschluss der Mutante aus den Membran-Rafts, da man in diesem Fall eine nahezu lineare Funktion durch die Anpassung erwarten würde. Das spricht dafür, dass es weitere Raft-Signale in HA gibt, eines könnte zum Beispiel in dem nicht mutierten Anteil der Transmembranregion enthalten sein. Zudem war die Akzeptorkonzentration in den untersuchten Zellen sehr hoch, was ebenfalls ein Grund dafür sein könnte, dass immer ein gewisses Maß an Assoziation gemessen wurde. Verwendet man anstelle des Raft-Markers, YFP allein als Akzeptor, welches im Zytosol und im Zellkern nicht aber an der Plasmamembran vorkommt, könnte man erwarten, dass kein Energietransfer stattfindet und auch die  $K_D$  sehr hoch ist und die Anpassung einer Geraden ähnelt. Tatsächlich führte diese Messung zu einer  $K_D$  von ungefähr 4500 und einer schon relativ linearen Anpassung (persönliche Korrespondenz mit Bastian Thaa, IMB, FU Berlin). Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um nahezu die höchste  $K_D$ , die man unter den hier vorherrschenden Bedingungen, wie Akzeptorkonzentration und Mikroskopeinstellungen, erreichen kann. Dabei ist zu erwarten, dass alle Experimente, die MyrPal-YFP als Akzeptor beinhalten eine geringere  $K_D$  aufweisen, da dieses Konstrukt genau wie das HA an der Membran vorkommt und somit die Wahrscheinlichkeit der Clusterbildung höher ist. Auch der Befund, dass die Extraktion von Cholesterin keinen noch stärkeren Effekt auf die Cluster von HA mit dem Raft-Marker ausübte, könnte auf die Akzeptorkonzentration zurückzuführen sein. Es sollte dabei bedacht werden, dass Cholesterin viele Funktionen in der Membran besitzt und nicht nur der Raftbildung dient. Dadurch kann die Extraktion von Cholesterin auch Folgen nach sich ziehen, die nicht darauf beruhen, dass ein Protein in Rafts inkorporiert wurde (Munro, 2003).

Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern das Zytoskelett noch zusätzlich zu Rafts oder auch unabhängig von ihnen an der Clusterbildung zwischen HA und dem Raft-Marker beteiligt ist. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass das Zytoskelett eine wesentliche Rolle für die HA-Raft-Marker-Cluster spielt (Abb. 37). Diese Ergebnisse spiegeln sehr gut die Resultate anderer Arbeitsgruppen wider. Dort konnte mit Hilfe

der Immunelektronenmikroskopie und dem Einsatz von FPALM (Fluoreszenz-Photoaktivierungs-Lokalisierungs-Mikroskopie) gezeigt werden, dass es bei der Expression von HA in Zellen zur Bildung von Klustern kommt, die in ihrer Größe sehr stark variieren. Allerdings konnten nur die Kluster mit einer Größe im Nanometerbereich durch Cholesterinextraktion gestört werden. Dies führte zu der Annahme, dass die größeren Kluster durch andere Umstände, wie zum Beispiel durch den Einfluss des Zytoskeletts, entstanden sind (Hess et al., 2007; Hess et al., 2005; Leser und Lamb, 2005).

In weiterführenden Experimenten wurde überprüft, ob sich Kluster von HA mit dem Raft-Marker zusätzlich zur Inkorporation beider Proteine in Membran-Rafts ausbilden. Die Zerstörung des Zytoskeletts bei Zellen, die die Doppelmutante exprimieren, oder bei Zellen, denen zuvor schon Cholesterin entzogen worden war, zeigte dabei keine weitere Clusterreduktion von HA mit dem Raft-Marker (Abb. 37). Demnach ist es wahrscheinlich, dass das Aktin-Zytoskelett die Bildung und Dynamik von Rafts direkt beeinflusst, sei es durch die Bildung eines größeren Rafts aus mehreren kleineren oder durch die Stabilisierung bestehender Rafts in einem Zytoskelett-Kompartiment. Tatsächlich wurden kürzlich einige Studien veröffentlicht, die eine unterstützende Funktion des Zytoskeletts auf die Erhaltung von Rafts in einer Vielzahl zellulärer Prozesse aufgezeigt haben (Edidin, 2006; Lenne et al., 2006; Viola und Gupta, 2007). Im Falle der Influenzaviren konnte gezeigt werden, dass die Mikrofilamente sowohl die Organisation von Rafts als auch das Abknospen der filamentösen Viruspartikel beeinflussen (Simpson-Holley et al., 2002).

Alle hier durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass HA in lebenden Zellen in Membran-Rafts eingebaut wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Signale, die für den Einbau von HA in Detergens-resistente Membranen mitverantwortlich sind, auch eine Rolle bei der Integration von HA in Membran-Rafts besitzen. Ebenfalls wesentlich für die Ausbildung, Vergrößerung und Erhaltung von Rafts ist das Zytoskelett, wobei es die Inkorporation von HA in Rafts stabilisiert (Abb. 46).

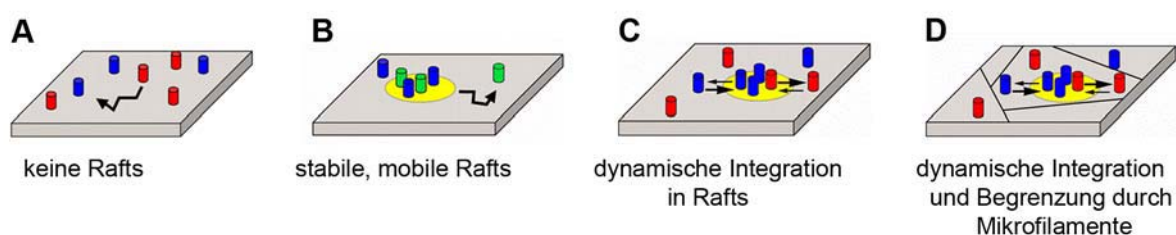
### **6.3 Die Raft-Affinität von HA beeinflusst dessen Diffusionsgeschwindigkeit in der Membran**

Neben der Affinität zu Membran-Rafts sollten auch die Diffusionseigenschaften von HA in der Plasmamembran untersucht werden. Hier war es vor allem von Bedeutung, den Einfluss

der Raft-Integration auf das HA-Protein zu untersuchen und überdies herauszufinden, ob etwas über die Verweilzeit von HA in einem Raft ausgesagt werden kann.

Durch den Vergleich von ungespaltenem HA und den zugehörigen Mutanten (C3S, VIL3A bzw. C3S + VIL3A) stellte sich heraus, dass die Diffusionsgeschwindigkeit mit steigender Raft-Affinität abnimmt, die mobile Fraktion jedoch ansteigt (Abb. 38). Das Zytoskelett hat hierbei keinen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Wildtyps und auf die der Doppelmutante (Abb. 40). Der Raft-Marker ist im Vergleich zu HA deutlich schneller und mobiler (Abb. 39).

Vier Modelle zur Diffusionsgeschwindigkeit von Raft- und Nicht-Raft-Proteinen der Plasmamembran sollen nun mit Hilfe der hier gewonnenen Ergebnisse analysiert werden (Abb. 47). Geht man, wie in Modell A beschrieben, davon aus, dass es gar keine Raft-Domänen in der Plasmamembran gibt, dann sollten alle Proteine, die auf die gleiche Weise in der Membran verankert sind, gleich schnell diffundieren, denn frühere Studien haben gezeigt, dass die Art der Verbindung mit der Membran, also durch eine Transmembranregion oder durch kovalent verknüpfte Lipide, eine wesentliche Rolle für die Diffusionsgeschwindigkeit spielt (Abb. 47 A) (Kenworthy et al., 2004). Wie Abbildung 38 jedoch zeigt, sind HA-Proteine, die mit Membran-Rafts assoziiert sind, langsamer als diejenigen mit geringerer Raft-Affinität. Man kann somit anhand der Diffusionseigenschaften der verschiedenen HA-Mutanten Modell A ausschließen.



**Abbildung 47: Modelle für die Diffusion von Proteinen in der Plasmamembran.** **A:** Die Membran ist eine homogene Lipidschicht ohne Domänen, oder aber der Einbau in Rafts hat keine Auswirkung auf die Diffusionseigenschaften eines Proteins. **B:** Die Rafts bewegen sich als stabile Einheiten innerhalb der Membran, und es findet nur eine sehr geringe Fluktuation der Proteine in und aus Rafts statt. **C:** Der Einbau von Proteinen in Rafts ist ein dynamischer Prozess, und die Diffusionseigenschaften eines Proteins setzen sich aus freien und in Raft integrierten Anteilen zusammen. **D:** Neben der Diffusionsreduktion eines Proteins durch Rafts wird diese auch noch durch das Mikrofilament-Netzwerk des Zytoskeletts behindert. Nach (Kenworthy et al., 2004).

In Modell B bilden Membran-Rafts für einen Zeitraum von Minuten stabile Plattformen, die sich als Einheit in der Plasmamembran bewegen (Abb. 47 B) (Pralle et al., 2000). Dieses Modell impliziert, dass Raft-Moleküle in FRAP-Experimenten mit einem Messzeitraum von Minuten gleich schnell diffundieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dieses Modell nicht zutreffen kann, denn anders als in dem Modell angenommen, diffundieren die hier untersuchten Raft-Proteine HA-YFP und MyrPal-YFP nicht gleich schnell (Abb. 39). In Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen zeigte auch der Vergleich von HA mit einem anderen Raft-Marker, dem Fyn-GFP, welches wie MyrPal-YFP myristyliert und palmityliert ist, dass Fyn-GFP ebenfalls um das 4,5fache schneller diffundiert als das dort gemessenen HA-Protein (van't Hof und Resh, 1997). Außerdem haben Versuche mit einer Vielzahl weiterer Raft-Proteine gezeigt, dass sich diese in ihren Diffusionseigenschaften zum Teil um mehr als das 10fache unterscheiden (Kenworthy et al., 2004; van't Hof und Resh, 1997).

Durch Modell C wird versucht, die Eigenschaft eines Proteins als frei bewegliche Einheit sowie seine Affinität zu Membran-Rafts zu kombinieren. Man nimmt dabei an, dass das Vorkommen eines Proteins in Rafts ein dynamischer Prozess ist, das heißt, dass die Proteine kontinuierlich in ein Raft eingegliedert werden, sich aber auch wieder aus dieser Domäne herauslösen (Abb. 47 C). Dadurch ist es auch nahe liegend, dass Proteine mit hoher Raft-Affinität langsamer diffundieren als solche mit einer geringen Raft-Affinität. Der Befund, dass in dieser Arbeit die Diffusionsgeschwindigkeit der HA-Proteine abhängig ist von der Raft-Affinität der jeweiligen Form, spiegelt die Annahme dieses Modells sehr gut wider. Auch die Resultate anderer Arbeitsgruppen lassen sich mit diesem Modell sehr gut beschreiben (Kenworthy et al., 2004; Shvartsman et al., 2003). Es gibt allerdings auch Arbeiten, in denen die Raft-assoziierten Proteine schneller diffundieren als Nicht-Raft-Proteine. Dabei handelt es sich allerdings um polarisierte Zellen, und es wird davon ausgegangen, dass der prozentuale Anteil der Raft-Domänen in der apikalen Membran flächenmäßig die der Nicht-Raft-Domänen übersteigt; somit können Raft-Proteine eher ungehindert diffundieren als Nicht-Raft-Proteine (Lebreton et al., 2008; Meder et al., 2006).

Modell D berücksichtigt zusätzlich zu Modell C auch noch den Einfluss des Zytoskeletts, welches in diesem Modell die Mobilität aller Proteine zusätzlich behindert (Abb. 47 D). Die Zerstörung des Zytoskeletts hatte in der vorliegenden Arbeit allerdings weder einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Raft-assoziierten Form von HA noch auf die nur sehr gering Raft-assoziierte Doppelmutante (Abb. 40). Die Ergebnisse der FLIM-FRET-

Experimente zeigten dagegen einen deutlichen Einfluss des Zytoskeletts auf die Raft-Affinität von HA (Abb. 37). Bei den Lebenszeitmessungen wird allerdings eine Veränderung des Energietransfers festgehalten und dies spielt sich im Nanosekundenbereich ab. Die hier durchgeführten FRAP-Messungen akkumulieren dagegen die Diffusion über einen Zeitraum von Minuten. Wie auch schon früher angenommen führt die Zerstörung des Zytoskeletts demnach wahrscheinlich zu einer Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit eines Proteins im Nanosekundenbereich, dies wird jedoch bei einer FRAP-Messung, die sich über eine Dauer von Minuten erstreckt, nicht sichtbar (Kusumi und Sako, 1996). Zudem gibt es Veröffentlichungen, die die Verweilzeiten von Proteinen innerhalb eines Zytoskelettkompartiments und die Wahrscheinlichkeit, eine solche Barriere zu passieren, in verschiedenen Zelltypen untersucht haben. Dort konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeit bei CHO-Zellen mit 1ms am kürzesten und die Chance, die Barriere zu passieren, am zweithöchsten ist im Vergleich zu den anderen Zelltypen (Kusumi et al., 2005). Auch dies deutet darauf hin, dass das Zytoskelett zumindest in dem hier verwendeten Zelltyp im Zeitrahmen einer FRAP-Messung eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Auf die Untersuchung der Proteine nach der Zerstörung der Rafts durch die Extraktion von Cholesterin wurde verzichtet, da dies schon früher zu sehr kontroversen Ergebnissen geführt hatte (Kenworthy et al., 2004; Munro, 2003; Shvartsman et al., 2003).

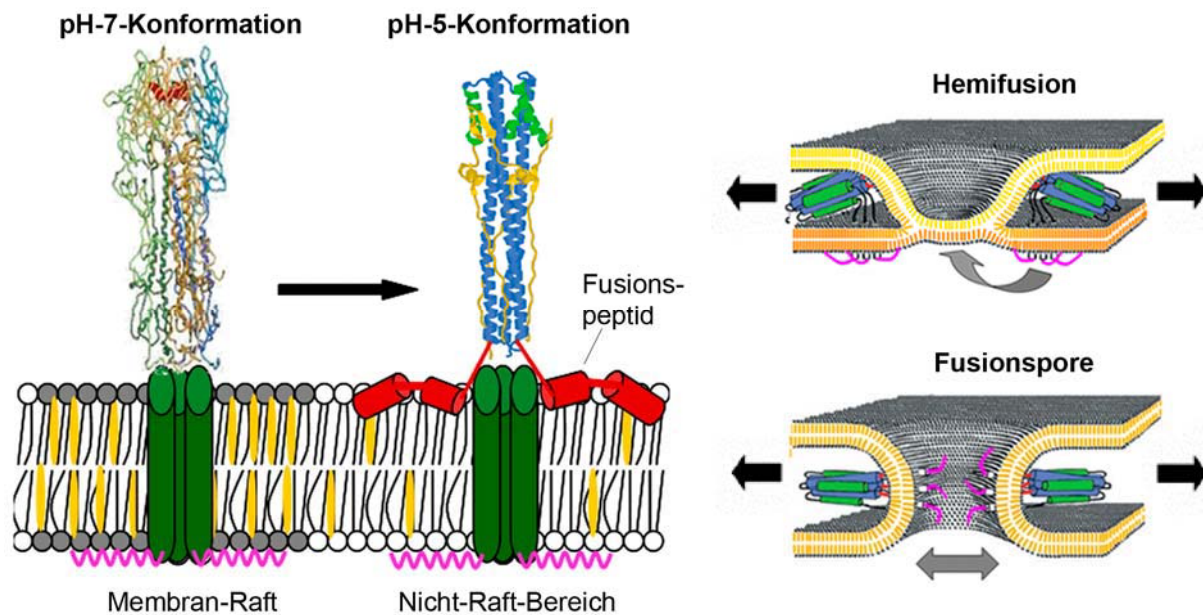
#### **6.4 Die Konvertierung der pH-7- zur pH-5-Konformation von HA beeinflusst dessen Raft-Assoziation**

Im Gegensatz zu ungespaltenem HA der pH-7-Konformation assoziiert spaltbares HA deutlich weniger mit dem Raft-Marker (Abb. 41). Dies liegt vermutlich daran, dass HA nach der proteolytischen Spaltung größtenteils schon intrazellulär in die pH-5-Konformation übergeht, da das viruseigene Protein M2 fehlt, um den leicht sauren pH des TGN zu neutralisieren (Takeuchi und Lamb, 1994). Die extrazelluläre Spaltung und die pH-5-Behandlung von uncl.-HA-Cer wt, welche die Änderung in die pH-5-Konformation auslöst, führt ebenfalls zu einer verringerten Affinität des Proteins zu Rafts (Abb. 44). Dabei konnte mit Hilfe von FRAP-Untersuchungen ausgeschlossen werden, dass eine möglicherweise durch die pH-5-Konformation ausgelöste Aggregatbildung der Proteine diesen Effekt erzeugt (Abb. 42).

Welche physiologische Bedeutung könnte diese Beobachtung im Rahmen einer Virusinfektion haben? Geht man davon aus, dass HA in der fusionsinaktiven Form nicht mehr in Rafts

eingelagert wird, so ist dies eventuell ein Hinweis darauf, dass es sich hierbei um eine interne Kontrolle des Virus handelt, denn wie schon in der Einleitung dargestellt, findet die Spaltung von HA in die beiden Untereinheiten im Trans-Golgi-Netzwerk statt (Abb. 6). Um zu verhindern, dass HA-Proteine, die trotz der Anwesenheit von M2 eine Konformationsänderung durchführen, in ein neu gebildetes Virion eingebaut werden, sind diese eventuell weniger affin zu Rafts und so von der Assembly-Stelle der Viren ausgeschlossen. Dabei muss auch bedacht werden, dass nur die HA-Subtypen H5 und H7 über diese intrazelluläre Spaltstelle verfügen. Alle anderen, werden grundsätzlich erst extrazellulär gespalten.

Aber nicht nur bei der Virusfreisetzung, sondern auch bei dem Fusionsprozess des Virus könnte diese verringerte Raft-Affinität der pH-5-Konformation von HA eine entscheidende Rolle spielen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das Fusionspeptid von HA, im Gegensatz zu dem Fusionspeptid E1 des Semliki-Forest-Virus, nicht mit Rafts assoziiert ist (Ahn et al., 2002). In einem normalen Fusionsvorgang bindet das Fusionspeptid, wie in der Einleitung beschrieben, an die gegenüberliegende Membran, und durch das Zusammenziehen des HA-Proteins nach dem Klappmesser-Prinzip nähern sich das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne an (Abb. 48) (Earp et al., 2005). Wenn durch das Herabsenken des pH-Wertes die fusionsfähige pH-5-Konformation ausgelöst wird, aber keine Membran zur Fusion zur Verfügung steht (wie bei den hier durchgeführten Experimenten), dann findet die weitere Konformationsänderung insofern statt, dass das Fusionspeptid sich dann an die selbe Membran anlagert, in welcher auch die Transmembranregion lokalisiert ist (Korte et al., 1999). Somit befindet sich das Fusionspeptid dann in beiden Fällen in räumlicher Nähe zur Transmembranregion (Abb. 48) (Skehel und Wiley, 2000). Das Fusionspeptid wird dabei aber nur in der äußeren Lipidschicht der Membran eingebaut und durchdringt diese nicht, denn es bildet sich eine Bumerang-ähnliche Struktur aus, die durch eine geknickte Helix entsteht (Han et al., 2001), und diese eckige Struktur ist möglicherweise nicht kompatibel mit den sehr dichten Lipidbündeln, die das HA in den Membran-Rafts umgeben. Diese Vermutung wurde auch schon in früheren Studien gemacht, da unter anderem anhand von molekular-dynamischen Studien gezeigt werden konnte, dass die Einlagerung des Fusionspeptids in die Membran zu einer Reduktion der dichten Lipidbündelung und somit zu einer Verdünnung der Doppelschicht führt. Diese von verschiedenen Arbeitsgruppen gewonnenen Befunde sind eindeutige Charakteristika von Nicht-Raft-Domänen (Han et al., 2001; Huang et al., 2004; Siegel und Epand, 2000; Vaccaro et al., 2005).



**Abbildung 48: Die pH-5-Konformation von HA hat eine verringerte Raft-Affinität.** In der pH-7-Konformation befindet sich das Fusionspeptid im Inneren der Ektodomäne. Durch die Spaltung und Behandlung mit pH 5 kommt es zu zahlreichen Konformationsänderungen, durch welche das HA dann befähigt ist, mit der gegenüberliegenden Membran zu fusionieren. Durch das Zusammenziehen des HA-Proteins werden so beide Membranen eng aneinander gezogen, bis sie miteinander verschmelzen. Anschließend kann sich eine Fusionspore ausbilden. Nach (Earp et al., 2005).

Bei Untersuchungen der eigentlichen Fusionsmembranen von Influenzaviren, der endosomalen Membran, wurde darüber hinaus entdeckt, dass diese sowohl Raft- als auch Nicht-Raft-Bereiche enthält (Sobo et al., 2007), und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass für die Fusion mit der Zielmembran keine Rafts benötigt werden (Rawat et al., 2003). Diese Befunde führen zu der Annahme, dass die Raft-Domänen der Virushüllmembran mit den Nicht-Raft-Domänen der endosomalen Membran fusionieren. Geht man nun davon aus, dass sich das Fusionspeptid bevorzugt in Nicht-Raft-Domänen einlagert, so bindet es auch in der endosomalen Membran die Nicht-Raft-Bereiche. Durch den weiteren Verlauf der Konformationsänderung, welche auf dem Klappmesser-Prinzip beruht, ziehen sich die TMD und das Fusionspeptid zusammen, um in eine stabile Konformation überzugehen. Hierbei kommt es auch zu einer Bewegung der umgebenden Lipide und somit zu einer Durchmischung der dichten Raft-Bereiche mit den Nicht-Raft-Lipiden. Diese Störung der dichtgepackten Bereiche erleichtert dann eventuell die Ausbildung der notwendigen Membrankrümmung, durch die dann eine kleine Fusionspore entstehen kann (Abb. 48), und darüber hinaus ist diese Durchmischung wahrscheinlich auch für die Vergrößerung der Pore mitverantwortlich (Chernomordik und Kozlov, 2005; Chernomordik und Kozlov, 2008). Man kann darüber hinaus davon ausgehen,



dass bei der Konformationsänderung nicht alle Fusionspeptide in die gegenüberliegende endosomale Membran eingelagert werden; zum Teil werden sie sich in die viruseigene Membran einlagern (Bentz und Mittal, 2003) und hierbei demnach wahrscheinlich in Bereiche, die Nicht-Raft-Domänen ähneln. Dies könnte dann zusätzlich zu einer Störung der Raft-Domänen in der Virusmembran führen. Wenn dies dann in enger Nachbarschaft zu HA-Proteinen geschieht, die mit der endosomalen Membran fusionieren, könnte die veränderte Lipidzusammensetzung der viralen Membran zusätzlich die Ausbildung einer Fusionspore erleichtern. Allerdings trifft es nicht zu, dass die reine Anwesenheit der Nicht-Raft-Lipide die Ausbildung einer Fusionspore erleichtert, denn anhand von HA-Mutanten, welche die Raft-Assoziation von HA reduzieren oder sogar eliminieren, konnte gezeigt werden, dass dies auch die Fusionsaktivität beeinträchtigt (Takeda et al., 2003; Wagner et al., 2005). Es ist demnach wahrscheinlicher, dass die Bewegung dieser Lipide zur Membranfusionstelle die Porenbildung erleichtert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch die Konformationsänderung ausgelöste verringerte Raft-Affinität eine Rolle bei der Fusion und/oder auch dem Zusammenbau der Viren spielen könnte. Die Fusion könnte insofern involviert sein, dass die Mischung von Raft- und Nicht-Raft-Lipiden zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung führt, bei der Membranfusion bevorzugt wird und somit die Fusionspore gebildet oder vergrößert werden kann. Hinsichtlich des viralen Zusammenbaus könnte die verringerte Raft-Affinität eine Art Absicherung darstellen, durch die gewährleistet wird, dass fusionsinaktive und somit für eine Neuinfektion unbrauchbare HA-Proteine von der Bildung neuer Virionen ausgeschlossen werden.

## 7 Ausblick

Der Austausch der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin zu Beginn der Transmembranregion führt zu einem verzögerten Transport von HA, der eventuell auf eine schlechtere Inkorporation dieser Proteine in die Exportdomänen der Golgi-Zisternen zurückzuführen ist. Um diese Hypothese weiter zu stärken, wäre es wichtig, diese Untersuchungen an einem artifiziellen Konstrukt durchzuführen, welches nur die Transmembrandomäne von HA enthält. Sollte auch dieselbe Verzögerung auftreten, könnte der Einfluss der Ektodomäne auf diesen verlangsamten Transport gänzlich ausgeschlossen werden. Desweiteren könnte man die Bildung der Membran-Rafts behindern, in dem man die Cholesterin-Synthese durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase inhibiert. Wenn der verzögerte Transport der TMD-Mutante tatsächlich auf einem erschwerten Einbau in Membran-Rafts beruht, dann sollten die Transportgeschwindigkeitsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante ohne das Vorhandensein von Rafts aufgehoben werden. Sehr interessant wäre auch die Struktur der Transmembrandomäne, mit und ohne diese Mutation, zu bestimmen, zum Beispiel mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen oder NMR-Spektroskopie. Allerdings ist dies bei Transmembranproteinen oft sehr schwierig durchführbar.

Für eine gezielte antivirale Therapie gegen Influenzaviren ist es darüber hinaus notwendig den Zusammenbau und die Freisetzung des Virus weiter aufzuklären. In der hier vorliegenden Arbeit wurde speziell HA untersucht. Ebenfalls wichtig wäre es die anderen Komponenten, die bei der Freisetzung eine Rolle spielen anhand dieser Methoden, auch in Kombination mit HA, zu untersuchen. Vorstellbar wäre, die Raft-Assoziation von HA unter zusätzlicher Koexpression von M1 zu messen wobei es schwer werden könnte die Expression von drei Konstrukten, HA, dem Raft-Marker und M1, in ausreichend Zellen zu gewährleisten. Interessant wäre, ob sich das Diffusionsverhalten von HA ändert, wenn das Matrixprotein M1 ebenfalls in den Zellen exprimiert wird. Auch die Raft-Assoziation der Neuraminidase (NA) könnte weiter untersucht und hier durch gezielte Mutationen bekannte DRM Signale von NA (Barman und Nayak, 2000) auf ihre Rolle im lebenden System untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

- Ahn, A.; Gibbons, D. L. und Kielian, M. (2002): The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domains, *J Virol* 76 [7], Seite 3267-75.
- Akarsu, H.; Burmeister, W. P.; Petosa, C.; Petit, I.; Muller, C. W.; Ruigrok, R. W. und Baudin, F. (2003): Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2), *EMBO J* 22 [18], Seite 4646-55.
- Ali, A.; Avalos, R. T.; Ponimaskin, E. und Nayak, D. P. (2000): Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein, *J Virol* 74 [18], Seite 8709-19.
- Alonso, M. A. und Millan, J. (2001): The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes, *J Cell Sci* 114 [Pt 22], Seite 3957-65.
- Andersen, O. S. und Koeppe, R. E., 2nd (2007): Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, Seite 107-30.
- Aragon, T.; de la Luna, S.; Novoa, I.; Carrasco, L.; Ortin, J. und Nieto, A. (2000): Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus, *Mol Cell Biol* 20 [17], Seite 6259-68.
- Arni, S.; Keilbaugh, S. A.; Ostermeyer, A. G. und Brown, D. A. (1998): Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues, *J Biol Chem* 273 [43], Seite 28478-85.
- Axelrod, D.; Koppel, D. E.; Schlessinger, J.; Elson, E. und Webb, W. W. (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys J* 16 [9], Seite 1055-69.
- Barman, S.; Adhikary, L.; Chakrabarti, A. K.; Bernas, C.; Kawaoka, Y. und Nayak, D. P. (2004): Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding, *J Virol* 78 [10], Seite 5258-69.
- Barman, S. und Nayak, D. P. (2000): Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association, *J Virol* 74 [14], Seite 6538-45.
- Bavari, S.; Bosio, C. M.; Wiegand, E.; Ruthel, G.; Will, A. B.; Geisbert, T. W.; Hevey, M.; Schmaljohn, C.; Schmaljohn, A. und Aman, M. J. (2002): Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses, *J Exp Med* 195 [5], Seite 593-602.
- Bentz, J. und Mittal, A. (2003): Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site, *Biochim Biophys Acta* 1614 [1], Seite 24-35.
- Berthiaume, L. und Resh, M. D. (1995): Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins, *J Biol Chem* 270 [38], Seite 22399-405.
- Bijlmakers, M. J. und Marsh, M. (2003): The on-off story of protein palmitoylation, *Trends Cell Biol* 13 [1], Seite 32-42.
- Blumenthal, R.; Sarkar, D. P.; Durell, S.; Howard, D. E. und Morris, S. J. (1996): Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events, *J Cell Biol* 135 [1], Seite 63-71.

- Briggs, J. A.; Wilk, T. und Fuller, S. D. (2003): Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping?, *J Gen Virol* 84 [Pt 4], Seite 757-68.
- Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68 [3], Seite 533-44.
- Bui, M.; Wills, E. G.; Helenius, A. und Whittaker, G. R. (2000): Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins, *J Virol* 74 [4], Seite 1781-6.
- Carr, C. M.; Chaudhry, C. und Kim, P. S. (1997): Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [26], Seite 14306-13.
- Carrasco, M.; Amorim, M. J. und Digard, P. (2004): Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane, *Traffic* 5 [12], Seite 979-92.
- Chen, B. J.; Takeda, M. und Lamb, R. A. (2005): Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly, *J Virol* 79 [21], Seite 13673-84.
- Chen, Y.; Mills, J. D. und Periasamy, A. (2003): Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM, *Differentiation* 71 [9-10], Seite 528-41.
- Chernomordik, L. V. und Kozlov, M. M. (2005): Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps, *Cell* 123 [3], Seite 375-82.
- Chernomordik, L. V. und Kozlov, M. M. (2008): Mechanics of membrane fusion, *Nat Struct Mol Biol* 15 [7], Seite 675-83.
- Chichili, G. R. und Rodgers, W. (2007): Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton, *J Biol Chem* 282 [50], Seite 36682-91.
- Cooper, J. A. (1987): Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J Cell Biol* 105 [4], Seite 1473-8.
- Copeland, C. S.; Doms, R. W.; Bolzau, E. M.; Webster, R. G. und Helenius, A. (1986): Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport, *J Cell Biol* 103 [4], Seite 1179-91.
- Copeland, C. S.; Zimmer, K. P.; Wagner, K. R.; Healey, G. A.; Mellman, I. und Helenius, A. (1988): Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin, *Cell* 53 [2], Seite 197-209.
- Cros, J. F. und Palese, P. (2003): Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses, *Virus Res* 95 [1-2], Seite 3-12.
- da Silva, A. M. und Klein, C. (1990): A rapid posttranslational myristylation of a 68-kD protein in *D. discoideum*, *J Cell Biol* 111 [2], Seite 401-7.
- Danieli, T.; Pelletier, S. L.; Henis, Y. I. und White, J. M. (1996): Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers, *J Cell Biol* 133 [3], Seite 559-69.
- de Almeida, R. F.; Fedorov, A. und Prieto, M. (2003): Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys J* 85 [4], Seite 2406-16.
- Doyle, C.; Roth, M. G.; Sambrook, J. und Gething, M. J. (1985): Mutations in the cytoplasmic domain of the influenza virus hemagglutinin affect different stages of intracellular transport, *J Cell Biol* 100 [3], Seite 704-14.

- Earp, L. J.; Delos, S. E.; Park, H. E. und White, J. M. (2005): The many mechanisms of viral membrane fusion proteins, *Curr Top Microbiol Immunol* 285, Seite 25-66.
- Edidin, M. (2003): The state of lipid rafts: from model membranes to cells, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, Seite 257-83.
- Edidin, M. (2006): Switching sides: the actin/membrane lipid connection, *Biophys J* 91 [11], Seite 3963.
- Enami, M. und Enami, K. (1996): Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein, *J Virol* 70 [10], Seite 6653-7.
- Fiedler, K.; Kobayashi, T.; Kurzchalia, T. V. und Simons, K. (1993): Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells, *Biochemistry* 32 [25], Seite 6365-73.
- Förster, T. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderungen und Fluoreszenz, *Annalen der Physik* 437 [1-2], Seite 55-75.
- Gandhavadi, M.; Allende, D.; Vidal, A.; Simon, S. A. und McIntosh, T. J. (2002): Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts, *Biophys J* 82 [3], Seite 1469-82.
- Garten, W. und Klenk, H. D. (1999): Understanding influenza virus pathogenicity, *Trends Microbiol* 7 [3], Seite 99-100.
- Gething, M. J.; Doms, R. W.; York, D. und White, J. (1986): Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus, *J Cell Biol* 102 [1], Seite 11-23.
- Gething, M. J.; McCammon, K. und Sambrook, J. (1986): Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport, *Cell* 46 [6], Seite 939-50.
- Glebov, O. O. und Nichols, B. J. (2004): Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor, *Nat Cell Biol* 6 [3], Seite 238-43.
- Goodwin, J. S. und Kenworthy, A. K. (2005): Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells, *Methods* 37 [2], Seite 154-64.
- Han, X.; Bushweller, J. H.; Cafiso, D. S. und Tamm, L. K. (2001): Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin, *Nat Struct Biol* 8 [8], Seite 715-20.
- Heerklotz, H. (2002): Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures, *Biophys J* 83 [5], Seite 2693-701.
- Hess, S. T.; Gould, T. J.; Gudheti, M. V.; Maas, S. A.; Mills, K. D. und Zimmerberg, J. (2007): Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hess, S. T.; Kumar, M.; Verma, A.; Farrington, J.; Kenworthy, A. und Zimmerberg, J. (2005): Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin, *J Cell Biol* 169 [6], Seite 965-76.
- Huang, Q.; Chen, C. L. und Herrmann, A. (2004): Bilayer conformation of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin: a molecular dynamics simulation study, *Biophys J* 87 [1], Seite 14-22.
- Huang, R. T.; Rott, R.; Wahn, K.; Klenk, H. D. und Kohama, T. (1980): The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses, *Virology* 107 [2], Seite 313-9.

- Ikonen, E. (2001): Roles of lipid rafts in membrane transport, *Curr Opin Cell Biol* 13 [4], Seite 470-7.
- Jacobson, K. und Dietrich, C. (1999): Looking at lipid rafts?, *Trends Cell Biol* 9 [3], Seite 87-91.
- Jacobson, K.; Mouritsen, O. G. und Anderson, R. G. (2007): Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nat Cell Biol* 9 [1], Seite 7-14.
- Jares-Erijman, E. A. und Jovin, T. M. (2003): FRET imaging, *Nat Biotechnol* 21 [11], Seite 1387-95.
- Keil, W.; Geyer, R.; Dabrowski, J.; Dabrowski, U.; Niemann, H.; Stirm, S. und Klenk, H. D. (1985): Carbohydrates of influenza virus. Structural elucidation of the individual glycans of the FPV hemagglutinin by two-dimensional <sup>1</sup>H n.m.r. and methylation analysis, *Embo J* 4 [10], Seite 2711-20.
- Keller, P. und Simons, K. (1998): Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin, *J Cell Biol* 140 [6], Seite 1357-67.
- Kenworthy, A. K. und Edidin, M. (1998): Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer, *J Cell Biol* 142 [1], Seite 69-84.
- Kenworthy, A. K.; Nichols, B. J.; Remmert, C. L.; Hendrix, G. M.; Kumar, M.; Zimmerberg, J. und Lippincott-Schwartz, J. (2004): Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface, *J Cell Biol* 165 [5], Seite 735-46.
- Kenworthy, A. K.; Petranova, N. und Edidin, M. (2000): High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes, *Mol Biol Cell* 11 [5], Seite 1645-55.
- Klenk, H. D. (1974): Viral envelopes and their relationship to cellular membranes, *Curr Top Microbiol Immunol* [68], Seite 29-58.
- Klenk, H. D. und Rott, R. (1988): The molecular biology of influenza virus pathogenicity, *Adv Virus Res* 34, Seite 247-81.
- Klenk, H. D.; Rott, R.; Orlich, M. und Blodorn, J. (1975): Activation of influenza A viruses by trypsin treatment, *Virology* 68 [2], Seite 426-39.
- Klumpp, K.; Ruigrok, R. W. und Baudin, F. (1997): Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure, *EMBO J* 16 [6], Seite 1248-57.
- Kordyukova, L. V.; Serebryakova, M. V.; Baratova, L. A. und Veit, M. (2008): S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine, *J Virol* 82 [18], Seite 9288-92.
- Korte, T.; Ludwig, K.; Booy, F. P.; Blumenthal, R. und Herrmann, A. (1999): Conformational intermediates and fusion activity of influenza virus hemagglutinin, *J Virol* 73 [6], Seite 4567-74.
- Krug, R.M. und Lamb, R.A. (2001): *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication*, Fields Virology. 4th edition, editors: Knipe DM, Howley PM., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kusumi, A.; Ike, H.; Nakada, C.; Murase, K. und Fujiwara, T. (2005): Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules, *Semin Immunol* 17 [1], Seite 3-21.

- Kusumi, A.; Koyama-Honda, I. und Suzuki, K. (2004): Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts, *Traffic* 5 [4], Seite 213-30.
- Kusumi, A. und Sako, Y. (1996): Cell surface organization by the membrane skeleton, *Curr Opin Cell Biol* 8 [4], Seite 566-74.
- Kusumi, A. und Suzuki, K. (2005): Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions, *Biochim Biophys Acta* 1746 [3], Seite 234-51.
- Kwon, G.; Axelrod, D. und Neubig, R. R. (1994): Lateral mobility of tetramethylrhodamine (TMR) labelled G protein alpha and beta gamma subunits in NG 108-15 cells, *Cell Signal* 6 [6], Seite 663-79.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-5.
- Lebreton, S.; Paladino, S. und Zurzolo, C. (2008): Selective roles for cholesterol and actin in compartmentalisation of different proteins in golgi and plasma membrane of polarized cells, *J Biol Chem*.
- Lenne, P. F.; Wawrezynieck, L.; Conchonaud, F.; Wurtz, O.; Boned, A.; Guo, X. J.; Rigneault, H.; He, H. T. und Marguet, D. (2006): Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork, *EMBO J* 25 [14], Seite 3245-56.
- Leser, G. P. und Lamb, R. A. (2005): Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins, *Virology* 342 [2], Seite 215-27.
- Lin, S.; Naim, H. Y.; Rodriguez, A. C. und Roth, M. G. (1998): Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells, *J Cell Biol* 142 [1], Seite 51-7.
- Lindwasser, O. W. und Resh, M. D. (2001): Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains, *J Virol* 75 [17], Seite 7913-24.
- Lippincott-Schwartz, J.; Snapp, E. und Kenworthy, A. (2001): Studying protein dynamics in living cells, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [6], Seite 444-56.
- Martin, K. und Helenius, A. (1991): Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus, *J Virol* 65 [1], Seite 232-44.
- Mayor, S. und Rao, M. (2004): Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface, *Traffic* 5 [4], Seite 231-40.
- Mayor, S.; Rothberg, K. G. und Maxfield, F. R. (1994): Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking, *Science* 264 [5167], Seite 1948-51.
- Meder, D.; Moreno, M. J.; Verkade, P.; Vaz, W. L. und Simons, K. (2006): Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [2], Seite 329-34.
- Melkonian, K. A.; Ostermeyer, A. G.; Chen, J. Z.; Roth, M. G. und Brown, D. A. (1999): Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated, *J Biol Chem* 274 [6], Seite 3910-7.
- Milligan, G.; Parenti, M. und Magee, A. I. (1995): The dynamic role of palmitoylation in signal transduction, *Trends Biochem Sci* 20 [5], Seite 181-7.

- Millington, M.; Grindlay, G. J.; Altenbach, K.; Neely, R. K.; Kolch, W.; Bencina, M.; Read, N. D.; Jones, A. C.; Dryden, D. T. und Magennis, S. W. (2007): High-precision FLIM-FRET in fixed and living cells reveals heterogeneity in a simple CFP-YFP fusion protein, *Biophys Chem* 127 [3], Seite 155-64.
- Mitra, K.; Ubarretxena-Belandia, I.; Taguchi, T.; Warren, G. und Engelman, D. M. (2004): Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [12], Seite 4083-8.
- Mukherjee, S. und Maxfield, F. R. (2004): Membrane domains, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, Seite 839-66.
- Müller, H. (2006): [Biology of influenza viruses], *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119 [3-4], Seite 91-100.
- Munro, S. (1998): Localization of proteins to the Golgi apparatus, *Trends Cell Biol* 8 [1], Seite 11-5.
- Munro, S. (2003): Lipid rafts: elusive or illusive?, *Cell* 115 [4], Seite 377-88.
- Nayak, D. P.; Hui, E. K. und Barman, S. (2004): Assembly and budding of influenza virus, *Virus Res* 106 [2], Seite 147-65.
- Nichols, B. J. und Lippincott-Schwartz, J. (2001): Endocytosis without clathrin coats, *Trends Cell Biol* 11 [10], Seite 406-12.
- Ohuchi, M.; Cramer, A.; Vey, M.; Ohuchi, R.; Garten, W. und Klenk, H. D. (1994): Rescue of vector-expressed fowl plague virus hemagglutinin in biologically active form by acidotropic agents and coexpressed M2 protein, *J Virol* 68 [2], Seite 920-6.
- Ono, A. und Freed, E. O. (2001): Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [24], Seite 13925-30.
- Palese, P.; Tobita, K.; Ueda, M. und Compans, R. W. (1974): Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase, *Virology* 61 [2], Seite 397-410.
- Patterson, G. H.; Hirschberg, K.; Polishchuk, R. S.; Gerlich, D.; Phair, R. D. und Lippincott-Schwartz, J. (2008): Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system, *Cell* 133 [6], Seite 1055-67.
- Pickl, W. F.; Pimentel-Muinos, F. X. und Seed, B. (2001): Lipid rafts and pseudotyping, *J Virol* 75 [15], Seite 7175-83.
- Pike, L. J. (2006): Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, *J Lipid Res* 47 [7], Seite 1597-8.
- Piston, D. W. und Kremers, G. J. (2007): Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly, *Trends Biochem Sci* 32 [9], Seite 407-14.
- Pomorski, T.; Hrafnisdottir, S.; Devaux, P. F. und van Meer, G. (2001): Lipid distribution and transport across cellular membranes, *Semin Cell Dev Biol* 12 [2], Seite 139-48.
- Pralle, A.; Keller, P.; Florin, E. L.; Simons, K. und Horber, J. K. (2000): Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J Cell Biol* 148 [5], Seite 997-1008.
- Rawat, S. S.; Viard, M.; Gallo, S. A.; Rein, A.; Blumenthal, R. und Puri, A. (2003): Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review), *Mol Membr Biol* 20 [3], Seite 243-54.



- Razinkov, V. I.; Melikyan, G. B. und Cohen, F. S. (1999): Hemifusion between cells expressing hemagglutinin of influenza virus and planar membranes can precede the formation of fusion pores that subsequently fully enlarge, *Biophys J* 77 [6], Seite 3144-51.
- Ritchie, K. und Kusumi, A. (2003): Single-particle tracking image microscopy, *Methods Enzymol* 360, Seite 618-34.
- Rizzo, M. A.; Springer, G. H.; Granada, B. und Piston, D. W. (2004): An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET, *Nat Biotechnol* 22 [4], Seite 445-9.
- Roberts, P. C.; Garten, W. und Klenk, H. D. (1993): Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin, *J Virol* 67 [6], Seite 3048-60.
- Ronchi, P.; Colombo, S.; Francolini, M. und Borgese, N. (2008): Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol* 181 [1], Seite 105-18.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230 [4732], Seite 1350-4.
- Sakaguchi, T.; Leser, G. P. und Lamb, R. A. (1996): The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus, *J Cell Biol* 133 [4], Seite 733-47.
- Scheiffele, P.; Rietveld, A.; Wilk, T. und Simons, K. (1999): Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane, *J Biol Chem* 274 [4], Seite 2038-44.
- Scheiffele, P.; Roth, M. G. und Simons, K. (1997): Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain, *Embo J* 16 [18], Seite 5501-8.
- Schroeder, R. J.; Ahmed, S. N.; Zhu, Y.; London, E. und Brown, D. A. (1998): Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains, *J Biol Chem* 273 [2], Seite 1150-7.
- Schuck, S.; Honsho, M.; Ekroos, K.; Shevchenko, A. und Simons, K. (2003): Resistance of cell membranes to different detergents, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [10], Seite 5795-800.
- Shenoy-Scaria, A. M.; Dietzen, D. J.; Kwong, J.; Link, D. C. und Lublin, D. M. (1994): Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae, *J Cell Biol* 126 [2], Seite 353-63.
- Shvartsman, D. E.; Kotler, M.; Tall, R. D.; Roth, M. G. und Henis, Y. I. (2003): Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts, *J Cell Biol* 163 [4], Seite 879-88.
- Siegel, D. P. und Epand, R. M. (2000): Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms, *Biochim Biophys Acta* 1468 [1-2], Seite 87-98.
- Silvius, J. R. und Nabi, I. R. (2006): Fluorescence-quenching and resonance energy transfer studies of lipid microdomains in model and biological membranes, *Mol Membr Biol* 23 [1], Seite 5-16.

- Simons, K. und Ehehalt, R. (2002): Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J Clin Invest* 110 [5], Seite 597-603.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 [1], Seite 31-9.
- Simons, K. und van Meer, G. (1988): Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry* 27 [17], Seite 6197-202.
- Simons, K. und Vaz, W. L. (2004): Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, Seite 269-95.
- Simpson-Holley, M.; Ellis, D.; Fisher, D.; Elton, D.; McCauley, J. und Digard, P. (2002): A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions, *Virology* 301 [2], Seite 212-25.
- Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 [23], Seite 720-31.
- Skehel, J. J.; Cross, K.; Steinhauer, D. und Wiley, D. C. (2001): Influenza fusion peptides, *Biochem Soc Trans* 29 [Pt 4], Seite 623-6.
- Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu Rev Biochem* 69, Seite 531-69.
- Skibbens, J. E.; Roth, M. G. und Matlin, K. S. (1989): Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and non-polar fibroblasts, *J Cell Biol* 108 [3], Seite 821-32.
- Sobo, K.; Chevallier, J.; Parton, R. G.; Gruenberg, J. und van der Goot, F. G. (2007): Diversity of raft-like domains in late endosomes, *PLoS ONE* 2 [4], Seite e391.
- Steinhauer, D. A. und Skehel, J. J. (2002): Genetics of influenza viruses, *Annu Rev Genet* 36, Seite 305-32.
- Subczynski, W. K. und Kusumi, A. (2003): Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy, *Biochim Biophys Acta* 1610 [2], Seite 231-43.
- Suomalainen, M. (2002): Lipid rafts and assembly of enveloped viruses, *Traffic* 3 [10], Seite 705-9.
- Takeda, M.; Leser, G. P.; Russell, C. J. und Lamb, R. A. (2003): Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [25], Seite 14610-7.
- Takeuchi, K. und Lamb, R. A. (1994): Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport, *J Virol* 68 [2], Seite 911-9.
- Urban, A.; Neukirchen, S. und Jaeger, K. E. (1997): A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR, *Nucleic Acids Res* 25 [11], Seite 2227-8.
- Vaccaro, L.; Cross, K. J.; Kleinjung, J.; Straus, S. K.; Thomas, D. J.; Wharton, S. A.; Skehel, J. J. und Fraternali, F. (2005): Plasticity of influenza haemagglutinin fusion peptides and their interaction with lipid bilayers, *Biophys J* 88 [1], Seite 25-36.
- van't Hof, W. und Resh, M. D. (1997): Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59<sup>fyn</sup>: selective requirement for NH<sub>2</sub>-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3, *J Cell Biol* 136 [5], Seite 1023-35.

- van der Goot, F. G. und Harder, T. (2001): Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack, *Semin Immunol* 13 [2], Seite 89-97.
- van Roessel, P. und Brand, A. H. (2002): Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins, *Nat Cell Biol* 4 [1], Seite E15-20.
- Veit, M.; Kretzschmar, E.; Kuroda, K.; Garten, W.; Schmidt, M. F.; Klenk, H. D. und Rott, R. (1991): Site-specific mutagenesis identifies three cysteine residues in the cytoplasmic tail as acylation sites of influenza virus hemagglutinin, *J Virol* 65 [5], Seite 2491-500.
- Veit, M.; Ponimaskin, E. und Schmidt, M. F. (2002): Analysis of S-acylation of proteins, *Methods Mol Biol* 194, Seite 159-78.
- Veit, M. und Schmidt, M. F. (1993): Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin, *FEBS Lett* 336 [2], Seite 243-7.
- Veit, M. und Schmidt, M. F. (2006): Palmitoylation of influenza virus proteins, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119 [3-4], Seite 112-22.
- Vey, M.; Orlich, M.; Adler, S.; Klenk, H. D.; Rott, R. und Garten, W. (1992): Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R, *Virology* 188 [1], Seite 408-13.
- Vincent, S.; Gerlier, D. und Manie, S. N. (2000): Measles virus assembly within membrane rafts, *J Virol* 74 [21], Seite 9911-5.
- Viola, A. und Gupta, N. (2007): Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins, *Nat Rev Immunol* 7 [11], Seite 889-96.
- Vogel, S. S.; Thaler, C. und Koushik, S. V. (2006): Fanciful FRET, *Sci STKE* 2006 [331], Seite re2.
- Wagner, R.; Herwig, A.; Azzouz, N. und Klenk, H. D. (2005): Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity, *J Virol* 79 [10], Seite 6449-58.
- Wallrabe, H. und Periasamy, A. (2005): Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, *Curr Opin Biotechnol* 16 [1], Seite 19-27.
- Whittaker, G. R. (2001): Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine, *Expert Rev Mol Med* 2001, Seite 1-13.
- Wilson, I. A.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1981): Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature* 289 [5796], Seite 366-73.
- Yguerabide, J.; Schmidt, J. A. und Yguerabide, E. E. (1982): Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys J* 40 [1], Seite 69-75.
- Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C. und Tsien, R. Y. (2002): Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science* 296 [5569], Seite 913-6.
- Zachowski, A. (1993): Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochem J* 294 ( Pt 1), Seite 1-14.
- Zhang, J.; Pekosz, A. und Lamb, R. A. (2000): Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins, *J Virol* 74 [10], Seite 4634-44.

- Zidovetzki, R. und Levitan, I. (2007): Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim Biophys Acta* 1768 [6], Seite 1311-24.
- Zurzolo, C.; van Meer, G. und Mayor, S. (2003): The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae, *EMBO Rep* 4 [12], Seite 1117-21.

## Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt Prof. Dr. Andreas Herrmann für die tolle Betreuung vor allem bei statistischen und mikroskopischen Problemen und wann immer ich sonst ein Anliegen hatte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei PD Dr. Michael Veit für seine hervorragende Unterstützung während der letzten drei Jahre. Er war mir stets ein sehr guter Betreuer und eine unerschöpfliche Quelle an Vorschlägen für weitere Versuche.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Silvia Scolari bedanken für die zahlreichen Stunden, die wir als Kolleginnen und Freundinnen zusammen verbracht haben, um unter anderem die jetzt so einfach aussehende Methode zu etablieren. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Problemchen in privater wie beruflicher Sicht hatte und immer mit einem italienisch-temperamentvollen Ratschlag aushelfen konnte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Doktoranden des IMB, besonders Aleksander Kabatek, Bastian Thaa, Julia Walter und Kizzie Kröger, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen und die die Zeit während der Doktorarbeit zu einer unvergesslichen werden ließen. Darüber hinaus möchte ich Bastian dafür danken, dass er einige Nächte zum Tag gemacht hat, um meiner Arbeit auch grammatikalisch den nötigen Schliff zu verleihen.

Ein weiterer Dank gehört drei lieben Menschen, die mich im Labor stets unterstützt haben und auch während der Mittagspausen immer für eine tolle Atmosphäre gesorgt haben: Ingrid Poesse, Christiane Palissa und Claudia Tielesch.

Auch Prof. M. F. G. Schmidt möchte ich danken, dafür, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen durfte; darüber hinaus danke ich ihm und dem gesamten Kollegium des IMB für die tolle Zeit hier. Ein weiterer Dank gilt der AG Biophysik, die mich so herzlich empfangen hat und mir bei den vielen kleinen und großen Problemen mit dem FV-1000 zur Seite stand. Hier gilt der Dank besonders dem „Männerbüro“: Thomas Korte, Jörg Nikolaus und Martin Stöckl.

Abschließend gebührt ein herzliches Dankeschön auch meinen Eltern, meinem Bruder Alexander und meinem Freund Philipp. Nur durch deren uneingeschränkte Unterstützung war es mir möglich, meinen Weg so zu gehen, wie ich es getan habe.

## Publikationen

Engel S., Scolari S., Sieben C., Thaa B., Krebs N., Korte T., Herrmann A. & Veit M. (2008). FLIM-FRET study on influenza virus hemagglutinin: Conversion to the post-fusion conformation reduces raft-association. Eingereicht bei Traffic

Scolari S., Engel S., Krebs N., Plazzo A., De Almeida R., Prieto M., Veit M. & Herrmann A. (2008). Lateral Distribution of the Transmembrane Domain of Influenza Virus Hemagglutinin – A FLIM-FRET and Energy Migration study. Eingereicht bei Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

Engel S., Scolari S., Krebs N., Thaa B., Korte T., Herrmann A. & Veit M. Shortening of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin leads to a delayed transport to the plasma membrane. Manuskript in Vorbereitung

**Patentantrag:** Erfindungsmeldung: Engel S., Herrmann A. & Veit M. (2007). „Influenza-virus: Fluoreszenzmarkiertes Hämagglutinin und Raft-Marker für die Wirkstoffsuche“.

## Vorträge

Engel S., Nachweis des Zusammenbaus von Influenza-Viruspartikeln in „lipid-rafts“ mittels FRET, Doktorandensymposium, FB Veterinärmedizin, FU Berlin, Deutschland, 2006

Engel S., Einsatz von biophysikalischen Methoden zum Nachweis für den Einbau von Influenza-Virusproteinen in „lipid-rafts“, Doktorandensymposium, FB Veterinärmedizin, FU Berlin, Deutschland, 2007

Engel S., Influenza HA localization in cellular membranes, Workshop: EMBO Course on Light Microscopy in Living Cells, Lissabon, Portugal, 2007

Engel S., Scolari S., Krebs N., Tievesch C., Herrmann A., Veit M.; Studying association of influenza virus HA with membrane-rafts using FRET, 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, Deutschland, 2008

## Poster

Engel S., Korte T., Tiesch C., Herrmann A. & Veit M.; Assembly of influenza virus proteins in lipid rafts analyzed with FRET, International Symposium: Optical Analysis of Biomolecular Machines, Berlin, Deutschland, 2006

Engel S., Korte T., Tiesch C., Herrmann A. & Veit M.; Assembly of influenza virus proteins in lipid-rafts analyzed with FRET, 58. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V., Mosbach, Deutschland, 2007

Engel S., Korte T., Tiesch C., Herrmann A. & Veit M.; Untersuchung der Assemblierung von Influenzaviren in „lipid-rafts“ mittels biophysikalischer Methoden, 27. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Berlin, Deutschland, 2007

Posterpreis 2007

Engel S., Scolari S., Krebs N., Herrmann A. & Veit M.; Nachweis des Einbaus von HA in „Membran-Rafts“ mittels biophysikalischer Methoden, Doktorandensymposium, FB Veterinärmedizin, FU Berlin, Deutschland, 2008

Engel S., Scolari S., Thaa B., Herrmann A. & Veit M.; FLIM-FRET study on influenza virus hemagglutinin (HA): The membrane fusion-mediating conformational change of HA reduces its association with rafts, Jahreskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Biophysik e.V., Berlin, Deutschland, 2008

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur verwendet zu haben.

Ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich anderwärts nicht um einen solchen beworben.

Die dem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Stephanie Engel, 15. Dezember 2008